

図3-8. *Spl12* の白葉枯病菌 (I 群菌, II 群菌およびIII群菌) 剪葉接種後 20 日目の病斑. 播種後 100 日目の植物の最上位展開葉に接種. (*Spl12/+*) はヘテロ個体, (*Spl12/Spl12*) はホモ個体, 原品種(WT) はヒノヒカリ. バーは標準偏差.

ヘテロ個体も同様に、一株穂数が原品種とほぼ同程度であったことを除けば、稈長、穂長および一株籾重は、ホモ個体と原品種の中間の値を示し、農業形質がいずれもホモ個体より優れていた(表 2-8)。従って今後、*Spl12* 遺伝子を単離し、*Spl12* 遺伝子の発現量を抑えた形質転換体を作成し、抵抗性程度を維持しながら擬似病斑の発現程度が少なく農業形質も優れた個体が得られる可能性が示唆された。

4) 擬似病斑葉突然変異体の葉鞘細胞の病害抵抗性

いもち病菌の接種方法には、噴霧接種法、注射接種法、パンチ接種法、針接種法、葉鞘向軸面接種法などがあるが、噴霧接種法、注射接種法、パンチ接種法、針接種法はいずれも接種後の病斑の伸展を主に観察する方法であり、葉鞘向軸面接種法はいもち病菌の植物細胞への付着器の形成や菌糸の伸展を直接観察することができる方法である(山崎と高坂 1980)。そこで、いもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示した *spl5-2*、*Spl12*、*spl13*、*spl14* および *Spl15* について、いもち病抵抗性反応の様子を検討するため、葉鞘向軸面接種を行った。播種後 8 週目および 12 週目の植物体の葉鞘向軸面にレース 007 (Ina86-137) を接種し 42 時間後に光学顕微鏡で観察した。

播種後 8 週目の植物体に接種した場合、原品種のヒノヒカリでは孢子から付着器が形成され、付着器から菌糸が長く伸展していた(図 3-9A, 表 3-2)。また、他の原品種であるコシヒカリ、台中 65 号も付着器からほぼ同程度の菌糸の伸展が見られた(表 3-2)。播種後 8 週目ですでに葉身に擬似病斑が現れていた *spl5-2*、*Spl12* および *Spl15* のうち、*Spl12* では付着器から菌糸が進展していたが、その伸展程度は原品種のヒノヒカリより抑制されており抵抗性が誘導されていた(図 3-9 E, 表 3-2)。しかしながら、*spl5-2* と *Spl15* では、付着器からの菌糸の伸展程度はほぼ原品種と同程度であり、抵抗性はまだ誘導されていなかった(図 3-9 A, C, K, 表 3-2)。一方、*spl13* と *spl14* の葉身には擬似病斑が播種後 8 週目では見られなかったが、付着器は形成されているものの菌糸の伸展は極めて抑制されており、すでに抵抗性が誘導されていた(図 3-9 G, I, 表 3-2)。*spl13* においてはいもち病菌の付着器の付いた細胞の細胞質が褐色に変化していた(図 3-9 G)。

播種後 12 週目の植物体に接種した場合、原品種のヒノヒカリおよびコシヒカリでは付着器から菌糸が、播種後 8 週目と同じ程度伸展していたが(図 3-9 B, 表 3-2)、いもち病圃場抵抗性がヒノヒカリおよびコシヒカリより強い台中 65 号は付着器からの菌糸の伸展が小さかった(表 3-2)。播種後 12 週目には、*spl5-2*、*Spl12*、*spl13*、*spl14* および *Spl15* のいずれも葉身に擬似病斑が見られ、いずれも付着器は形成されていたが、付

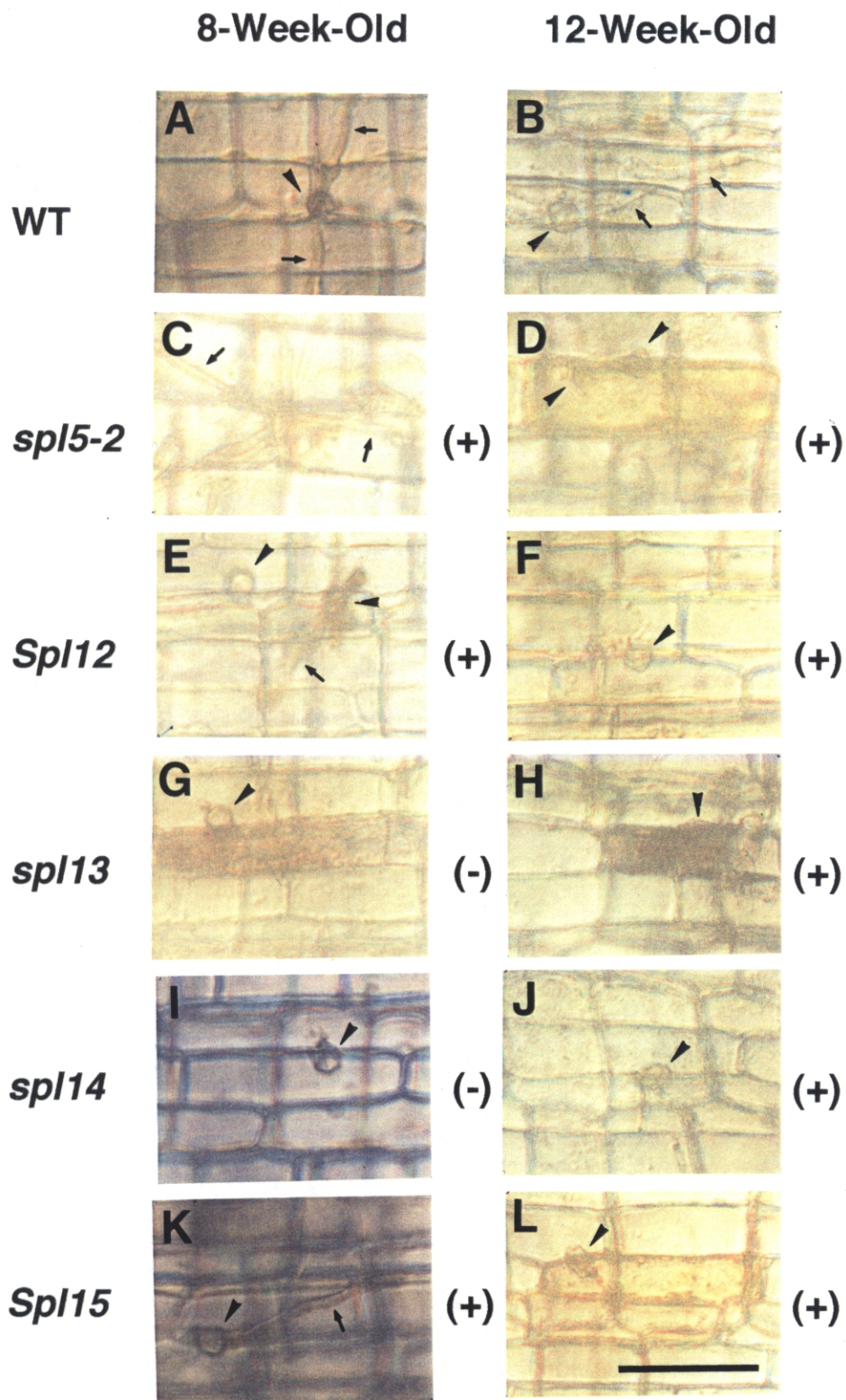


図3-9. いもち病菌(レース007)葉鞘向軸面(裏面)接種42時間後の菌糸の伸展程度. 左側の写真((A), (C), (E), (G), (I) および(K))は播種後8週目の葉鞘,右側の写真((B), (D), (F), (H), (J) および(L))は播種後12週目の葉鞘. 実験に供試した植物体の葉身の擬似病斑の有無(+;有り -;無し)を各写真の右側に示す. 原品種(WT)はヒノヒカリ(他の原品種もほぼ同様な菌糸の伸展を示した.). 矢頭は孢子から形成された付着器を, 矢印は侵入菌糸を示す. バーは50 μ m.

表 3-2. いもち病菌 (レース 007) 葉鞘裏面 (向軸面) 接種 42 時間後の菌糸の伸展程度

	ヒノヒカリ系統			台中 65 号系統			コシヒカリ系統		
	原品種	Sp112	sp113	原品種	sp15-2	sp114	原品種	Sp115	
<播種 60 日後>									
擬似病斑	-	+++	-	-	-	+	-	++	
菌糸伸展程度	+++++	++	+	+++++	+	+++	+++++	++++	
抵抗性程度	S	R	R	S	R	S	S	S	
<播種 80 日後>									
擬似病斑	-	+++	+	-	+	++	-	+++	
菌糸伸展程度	+++++	++	+	+++	+	+	+++++	+	
抵抗性程度	S	R	R	S	R	R	S	R	

1) 擬似病斑は - : なし + : 少 ++ : 中 +++ : 甚.

菌糸伸展程度は 6 段階 (- (なし) ~ +++++ (甚)) で評価.

抵抗性程度は R : 抵抗性 S : 原品種と同じ程度の罹病性とした.

着器からの菌糸の伸展は原品種より抑制されており、抵抗性が誘導されていた(図 3-9 B, D, F, H, J, L, 表 3-2). *spl13* においては播種後 8 週目と同様に、いもち病菌の付着器の付いた細胞の細胞質が褐色に変化していた(図 3-9 H).

以上の結果、いもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示した *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* のうち、*spl13* と *spl14* は擬似病斑が現れる前からいもち病抵抗性が誘導され、*spl5-2*, *Spl12* および *Spl15* は擬似病斑が現れた後にいもち病抵抗性が誘導されることが明らかになった.

spl5-2, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* の抵抗性反応として、付着器は形成されるが菌糸の伸びが抑制される現象が共通して観察され、これは、いもち病真性抵抗性遺伝子 *Piz-t* を持つ準同質遺伝子系統の非親和性菌に対する抵抗性反応と似ていた(Koga 1994). 従って、*spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* 遺伝子の作用が *Piz-t* と似ている可能性が示唆された.

ササニシキの *Pii* の同質遺伝子系統では、非親和性菌の噴霧接種後に、胞子の侵入を受けた細胞の褐変反応が見られたが、*Pik*, *Pik-m*, *Piz*, *Pita*, *Pita-2*, *Piz-t* および *Pib* の各々の同質遺伝子系統では、接種後の付着器下の細胞の細胞質に変化は見られなかった(芦澤ら 1997). また *Pii* 系統では、非親和性菌の接種により褐変細胞が生じた後で親和性菌を接種すると、菌糸の侵入が抑制されることが報告されている(芦澤ら 1998). 本実験では、播種後 8 週目および 12 週目のいずれにおいても、*spl13* においては菌糸の伸展が原品種より抑制され、いもち病菌の付着器の付いた細胞の細胞質に褐変が認められた. 従って、*spl13* の抵抗性反応は *Pii* と似ており、付着器の付いた細胞の細胞質に変化が見られなかった *spl5-2*, *Spl12*, *spl14* および *Spl15* は *Pik*, *Pik-m*, *Piz*, *Pita*, *Pita-2*, *Piz-t* および *Pib* の反応と似ていた.

5) 擬似病斑の発現程度と病害抵抗性

病害抵抗性の程度が葉位により異なっているかどうかを明らかにするために、いもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示した変異体のうち、葉の展開速度がほぼ同じであった *spl5-2*, *Spl12* の止葉(最上位展開葉)および止葉から数えて連続する 3 枚の葉について、白葉枯病菌の剪葉接種を行った. 播種後 100 日目の擬似病斑の発現程度は *spl5-2* では下位葉のほうが上位葉よりやや多く、*Spl12* では上位葉および下位葉のいずれも発現程度が激しかった(図 2-7, 図 2-13).

spl5-2 および *Spl12* は接種した全ての葉位の葉で各々の原品種である台中 65 号およびヒノヒカリより病斑の長さが短く、抵抗性を示した(図 3-10). また、同一個体内での

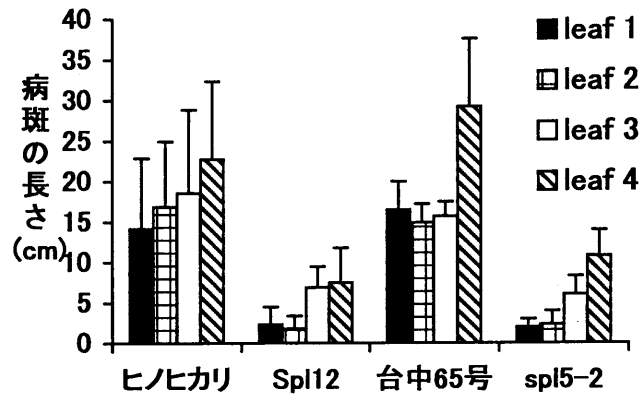


図3-10. *spl5-2* および *Spl12* の白葉枯病菌(Ⅲ群菌)剪葉接種後20日目の病斑の長さ. 播種後100日目の植物の最上位展開葉(leaf 1)およびその連続する下位葉(leaf 2, leaf 3 および leaf 4)に接種. バーは標準偏差.

抵抗性の程度は, *spl5-2*, *Spl12* および各々の原品種のいずれも下位葉より上位葉で大きかった(図 3-10).

擬似病斑葉変異体の葉位による病害抵抗性の違いがあるかどうか解析したという報告は今までにない. タバコのカタラーゼのアンチセンス遺伝子を発現する形質転換体は, 下位葉にのみネクロシスが現れて病害抵抗性を示すことが報告されている (Takahashi *et al.* 1997). 本実験では, 野生型においても, 病斑の伸展程度が下位葉より上位葉のほうが低かったことは, 植物体内での病害抵抗性程度が葉位によって異なっていることを示唆していた.

次に, 擬似病斑の発現する時期および程度と病害抵抗性の関連を明らかにするために, いもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示した *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* について, 播種後 2, 4, 6, 8 および 10 週の最上位展開葉に対して, 白葉枯病菌の剪葉接種を行った. 生育ステージによって病害抵抗性が異なるので, 各々の原品種の病斑の長さを 1 とした場合の相対値として求めた. 比較品種として, あそみのり(強), 日本晴(中), 金南風(弱)を用いた. また, 白葉枯病抵抗性検定をする植物体と同じ生育ステージの別の植物体について, 擬似病斑面積比率を調査した.

spl5-2 では, 播種後 6 週目から擬似病斑が現れたが, 擬似病斑面積比率は生育期間を通じて低かった(図 3-11A). 白葉枯病抵抗性は播種後 4 週目から誘導され, 接種による病斑の長さは播種後 4, 6, 8, 10 週目では原品種の約半分であった(図 3-11A).

Spl12 のホモ個体では, 擬似病斑は播種後 2 週目から現れ, 擬似病斑面積比率は生育が進むごとに極めて高くなった(図 3-11A). 白葉枯病抵抗性は播種後 4 週目から誘導され, 接種による病斑の長さは播種後 4, 6, 8, 10 週目では原品種の約 10~25% であった(図 3-11A).

Spl12 のヘテロ個体では, 擬似病斑は播種後 4 週目から現れたが, 擬似病斑面積比率は生育期間を通じて低かった(図 3-11A). 白葉枯病抵抗性は播種後 6 週目から誘導され, 接種による病斑の長さは播種後 6, 8, 10 週目では原品種の約 30~60% であった(図 3-11A).

spl13 では, 播種後 10 週目から擬似病斑が現れたが, 擬似病斑面積比率は生育期間を通じて低かった(図 3-11A). しかし, 白葉枯病抵抗性は播種後 2 週目から誘導され, 接種による病斑の長さは播種後 2, 4, 6, 8, 10 週目では原品種の約 30%, 播種後 10 週目では原品種の約 60% であった(図 3-11A).

spl14 では, 播種後 8 週目から擬似病斑が現れ, 擬似病斑面積比率は播種後 10 週

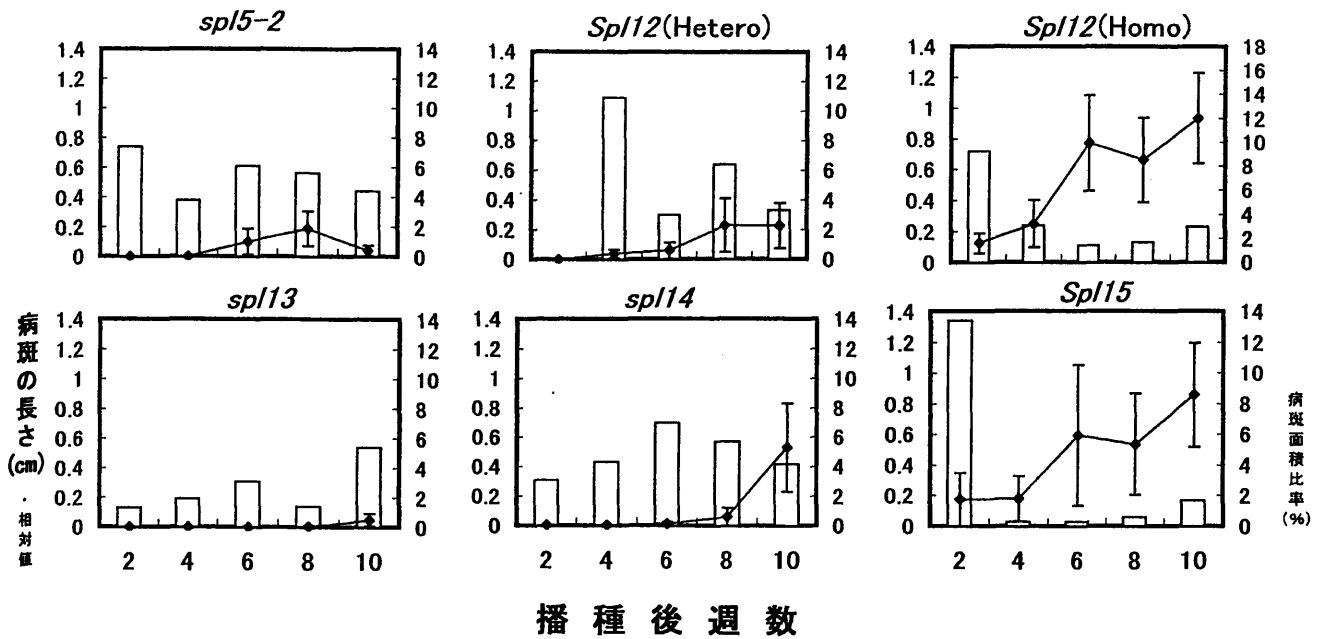


図3-11A. 擬似病斑葉突然変異体の白葉枯病抵抗性と擬似病斑出現程度。各生育時期の最上位展開葉に対して、白葉枯病菌を接種した時の各々の原品種の病斑の長さを1とした場合の相対値および未接種葉身中央部1cmの擬似病斑面積比率を求めた。棒グラフが白葉枯病の病斑の長さの相対値を、折れ線が擬似病斑面積比率(%)を示す。

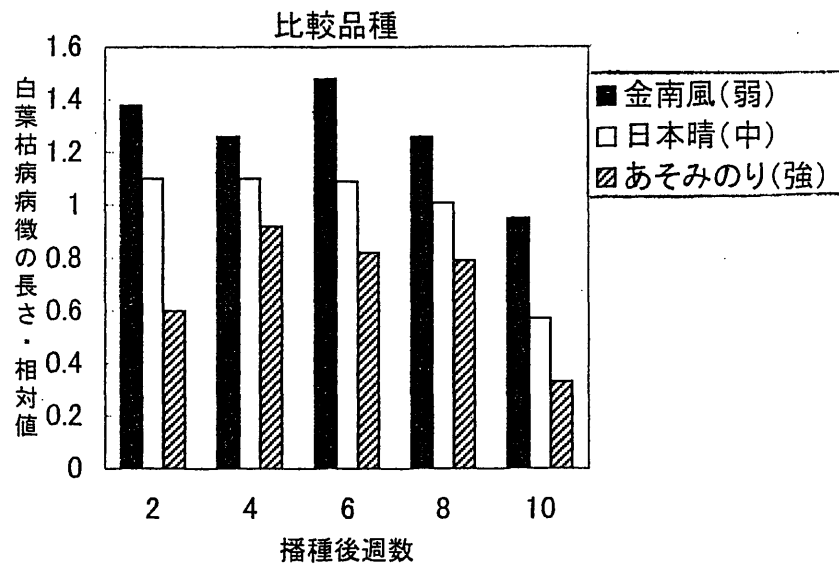


図3-11B. 野生型品種の白葉枯病抵抗性 (台中65号を1とした相対値)

目に高くなった。白葉枯病抵抗性は播種後 2 週目から誘導され、接種による病斑の長さは播種後 2, 4, 6, 8, 10 週目では原品種の約 30~70%であった(図 3-11A)。

Spl15 では、擬似病斑は播種後 2 週目から現れ、擬似病斑面積比率は生育が進むごとに極めて高くなった。白葉枯病抵抗性は播種後 4 週目から誘導され、接種による病斑の長さは播種後 4, 6, 8, 10 週目では原品種の 20%以下であった(図 3-11A)。

白葉枯病抵抗性が弱いとされている金南風では、台中 65 号と比較した場合、播種後 8 週目までは台中 65 号より病斑が長く、播種後 10 週目ではほぼ同程度であった(図 3-11B)。白葉枯病抵抗性が中程度とされている日本晴の病斑の長さは、播種後 8 週目までは台中 65 号とほぼ同程度で、播種後 10 週目では約 60%であった(図 3-11B)。白葉枯病抵抗性が強いとされているあそみのりの病斑の長さは、播種後 8 週目までは台中 65 号の約 60~80%で、播種後 10 週目では約 30%であった(図 3-11B)。

Spl12 および *Spl15* の原品種のヒノヒカリ、コシヒカリの抵抗性は金南風とほぼ同じである。白葉枯病抵抗性強であるあそみのりの病斑の長さは金南風の約半分であるのに対し、*Spl12* および *Spl15* の病斑は各々の原品種の 30%以下であった(図 3-11)。従って、*Spl12* および *Spl15* の白葉枯病抵抗性はあそみのりより強い可能性がある。

一方、*spl13* の原品種のヒノヒカリの抵抗性は金南風とほぼ同じである。白葉枯病抵抗性中である日本晴の病斑の長さは金南風の約 60%であるのに対し、*spl13* の病斑は原品種の約 70%以下であった(図 3-11)。従って、*spl13* の白葉枯病抵抗性は日本晴程度まで高められている可能性がある。

一方、*spl5-2* および *spl14* の原品種は台中 65 号である。あそみのりの病斑の長さは、播種後 8 週目までは台中 65 号の約 60~80%で、播種後 10 週目では約 30%であり、日本晴の病斑の長さは、播種後 8 週目までは台中 65 号とほぼ同程度で、播種後 10 週目では約 60%であるのに対し、*spl5-2* および *spl14* の病斑は原品種の約 70%以下であった(図 3-11)。従って、*spl5-2* および *spl14* の白葉枯病抵抗性は日本晴とあそみのりの中間程度である可能性がある。

優性の変異体である *Spl12* および *Spl15* は劣性の変異体である *spl5-2*、*spl13* および *spl14* より、生育初期から擬似病斑が現れ、擬似病斑面積比率も高く、病害抵抗性の程度も強かった。従って、*Spl12* および *Spl15* は *Spl* 遺伝子の過剰発現により病害抵抗性に関して正の制御をしている可能性が示唆された。また、*Spl12* および *Spl15* は恒常的に発現している可能性も考えられた。一方、劣性の変異体である *spl5-2*、*spl13* および *spl14* の原因遺伝子は病害抵抗性に関して負の制御因子である可能性が示唆さ

れた. *spl5-2*, *spl13* および *spl14* のうち, *spl13* および *spl14* は擬似病斑が現れる前の若い植物体においても抵抗性が誘導されていた. 従って, 擬似病斑が病害抵抗性に必要条件ではない可能性が考えられた.

イネの擬似病斑葉変異体のうち優性のものは, *Spl12* および *Spl15* 以外では, *Cdr3* しか報告されていない (Takahashi *et al.* 1999). *Cdr3* のホモ個体は播種後約 20 日目から擬似病斑が現れ, 矮性であり, 播種後約 30 日で枯死し, ヘテロ個体は播種後約 40 日目で擬似病斑が現れ, ホモ個体より擬似病斑の発現程度が低い (Takahashi *et al.* 1999). 従って, *Spl12*, *Spl15* および *Cdr3* の共通の特徴は擬似病斑が生育の早い時期から表れる点である. しかしながら, 擬似病斑といもち病抵抗性との関係は異なっており, *Spl12* および *Spl15* は擬似病斑が表れてから抵抗性を示すが, *Cdr3* は擬似病斑の有無に関わらず抵抗性を示す.

6) 二重突然変異体の病害抵抗性

Spl 遺伝子間の相互作用を明らかにするために, 二重変異体を作成してその表現型を解析した. *Spl12* と *spl14* は擬似病斑の色や形が異なるため二重変異体を識別することができた. F₂ 個体のうち, 擬似病斑を有する個体は, *Spl12*, *spl14* および2種類の二重変異体 (*Spl12/+ spl14/spl14* および *Spl12/Spl12 spl14/spl14*) に分けられた. *Spl12* については植物体の大きさと擬似病斑の発現程度でホモかヘテロかを推定することができた (第Ⅲ章3-3). 従って, 植物体が小さく, 擬似病斑の発現程度の激しい個体を *Spl12* についてホモと判断して, 二重変異体 (*Spl12/Spl12 spl14/spl14*) と判断して実験に用いた. *Spl12*, *spl14* および二重変異体に白葉枯病菌を接種したところ, 二重変異体の擬似病斑の発現は, *Spl12* および *spl14* の各々の擬似病斑が混在しており, 相加的であったが (図 3-12A), 病害抵抗性は *Spl12* よりは弱く, *spl14* とほぼ同程度であり, 相加的ではなかった (図 3-12B).

多くの擬似病斑葉変異体が単離されていることは, 擬似病斑の発現には多くの遺伝子が関与していることを示唆している. 個々の遺伝子について解析を進めることは重要であるが, 各遺伝子同士の関わりを明らかにすることも重要であり, 二重変異体の解析は擬似病斑の発現経路について解析するのに有効である. 二重変異体が相加的な表現型を示した場合, それらの遺伝子は独立して働いていると考えられる. トウモロコシでは, 2つの擬似病斑葉突然変異遺伝子 *Les*-2552* および *lls1* の間で協調的な関係が見られ, 同じ経路で働いているか又はある部分で経路が重なっていると推定された (Johal *et al.* 1995).

Spl12 spl14 の二重変異体は、擬似病斑の発現については相加的であったが、抵抗性については *Spl12* よりは弱く、*spl14* とほぼ同程度の抵抗性しか示さなかった。 *Spl12 spl14* の二重変異体における擬似病斑の発現および病害抵抗性については、*Spl12* と *spl14* が独立的に働いているのか、協調的に働いているのかは本実験からは判断できなかった。



図3-12A. *spl14*, *Spl12* および *Spl12spl14* の白葉枯病菌(Ⅲ群菌)剪葉接種後20日目の病斑. 播種後100日目の植物の最上位展開葉に接種. 原品種(WT)は台中65号. バーは3cm.

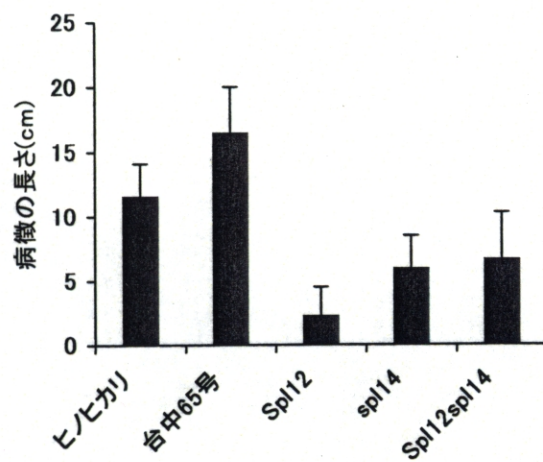


図3-12B. *Spl12*, *spl14* および *Spl12spl14* の白葉枯病菌(Ⅲ群菌)剪葉接種後20日目の病斑の長さ. 播種後100日目の植物の最上位展開葉に接種. バーは標準偏差.

IV 擬似病斑葉突然変異体における病害抵抗性関連遺伝子の発現

1 緒言

植物における病害抵抗性反応として、過敏反応, oxidative burst, ファイトアレキシンの生合成, 防御遺伝子の発現などが観察されている (Shimamoto and Kyozuka 2002).

タバコでは, タバコモザイクウイルスの感染によって壊死病斑が形成された葉で, 大量のサリチル酸およびPRタンパク質 (pathogenesis-related proteins: 感染特異的タンパク質) と総称される 10 数種のタンパク質が検出され, サリチル酸- β -グルコシドが植物体内を転流して未感染葉でもサリチル酸が蓄積して全身獲得抵抗性 (SAR) が誘導されることが明らかになった (長田と内宮 1995). サリチル酸は, 植物全般において自己防除シグナルとして働いている可能性があり, その抵抗性反応として誘導されてくるPRタンパク質は, その誘導的遺伝子発現機構を研究する材料として優れていることから, サリチル酸やPRタンパク質に関する研究が活発に行われるようになった.

シロイヌナズナでは, サリチル酸やPRタンパク質に関する変異体が多数単離されており, PRタンパク質の発現と病害抵抗性および擬似病斑の関連について研究されている. 内生サリチル酸が少ない変異体である *pad4* は *PR1* の発現が少なく病害抵抗性が低下しており, *PAD4* は triacyl glycerol lipase と相同性を示すタンパクをコードし, シグナル物質の代謝に関係していると推定された (Jirage *et al.* 2001). サリチル酸によるPRタンパク質などの発現誘導が起こらない変異体として *npr1* (nonexpresser of PR genes) および *nim1* が単離され, これらは同じ遺伝子座の変異によるとわかった (Jirage *et al.* 2001). 一方, サリチル酸やPR遺伝子を恒常的に発現する変異体の多くが擬似病斑を示し, 代表的なものとして *acd2*, *Acd6*, *lsd1-7*, *cpr5* (constitutive expresser of PR genes), *ssi1* などがあり, *CPR5* は機能の不明な新規の膜貫通型タンパク質をコードしていると推定された (Jirage *et al.* 2001). *Lsd6* および *Lsd7* は *PR1* および *PR2* が恒常的に発現している変異体として同定されたが, 同時に擬似病斑を形成し, その後抵抗性が確認された (Weymann *et al.* 1995). 従って, これらの変異体はサリチル酸やPR遺伝子を恒常的に発現することによって抵抗性を獲得し, 過敏反応の結果として擬似病斑が現れていると考えられた.

イネのPR遺伝子ファミリーはキチナーゼからなるPR-3グループ, グルカナナーゼから

なる PR-2 グループ, タウマチン様タンパクからなる PR-5 グループ, パーオキシダーゼからなる PR-9 グループ, PR-1 グループ, PR-10 グループ, フェニルアラニンアンモニアリアーゼ, およびプロベナゾール誘導性の *PBZ1* などがわかっている (Song and Goodman 2001).

タバコやシロイヌナズナの *PR* 遺伝子ファミリーの多くが, 物理的傷害で発現が誘導されるタイプと, 傷害では発現が誘導されないタイプに分けられるが, 傷害非誘導性タイプに相同性のあるイネ *PR* 遺伝子が傷害で誘導されることが明らかになり, *PR* 遺伝子の発現制御の機構はイネとタバコなどとは異なることが示唆された (佐々木 2004). 現在, イネの *PR* 遺伝子群のクローニングが複数のグループにより進められている (Agrawal *et al.* 2000, Cooper *et al.* 2003).

イネにおいても *PR* 遺伝子と病害抵抗性との関連について研究が進められている. いもち病菌に対する抵抗性反応において, イネの *PR1* 遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった (Schweizer *et al.* 1998). プロベナゾール (3-allyloxy-1, 2-benzisothiazole-1, 1-dioxide) はいもち病に対するイネの全身獲得抵抗性を誘導する農薬であるが, *PBZ1* は, プロベナゾールをイネに処理した際に発現が誘導される遺伝子の一つであり, 細胞内の *PR* タンパクをコードしていることがわかった (Midoh and Iwata 1996, 1997). また, *PBZ1* 遺伝子は傷害刺激では発現が誘導されず, いもち病菌の接種により誘導されるが, 親和性の菌よりも非親和性の菌の接種によって早く誘導されることが明らかになった (Midoh and Iwata 1996, 1997).

キチナーゼは病原菌の細胞壁の主要な構成要素であるキチンを分解する酵素である. *PR* タンパクの一つであるキチナーゼはその推定されるアミノ酸配列の構造の違いからクラス I キチナーゼ, クラス II キチナーゼ, クラス III キチナーゼに分類され, イネではクラス I キチナーゼとして, *Ch1*, *Ch2*, *Ch3* などが単離され, *Ch2* を導入したタバコでうどんこ病抵抗性が誘導されていた (西澤ら 1992). また, イネ由来のキチナーゼ遺伝子をイネで過剰発現させることにより白葉枯病抵抗性が誘導され (Lin *et al.* 1995), *Ch2* あるいは *Ch3* をイネで過剰発現させることにより, いずれもいもち病抵抗性が誘導された (Nishizawa *et al.* 1999a). さらに, エリシター処理によるキチナーゼ遺伝子の発現の誘導にはタンパク質のリン酸化が必要であることも明らかになった (Nishizawa *et al.* 1999b). *Ch3* は, 塩化水銀, 傷害刺激, 又は UV 光を葉に処理すると発現が誘導され, 液体けんたく培養細胞においては, glycol chitin, glycol chitosan, 又は pectic acids 処理により *Ch3* の mRNA 量が増加した (Nishizawa *et al.* 1993).

植物組織の表層のクチクラ層や細胞壁は、病原体に対する構造的な障壁になっているだけでなく、微生物やウイルスの感染により、細胞壁はカロースやリグニン形成および高ヒドロキシプロリン糖タンパク質の合成などによる修飾や強化を受けて病原菌に対して植物体を守ろうとしていることが明らかになっている(長田と内宮 1995). イネにおいては、いもち病菌を葉鞘向軸面に接種すると、細胞死を起こした細胞内において、自家蛍光物質が蓄積するまで菌糸の伸長が続くことが明らかになった(Koga 1994). また、熱ショックにより細胞死を起こしてもいもち病菌の菌糸の伸長を抑制することはできないことが明らかになり(Koga 1994), 細胞死のみでは菌糸の伸長を抑制することはできず、自家蛍光物質が蓄積することが必要であると考えられた. また、いもち病菌を葉鞘向軸面に接種した場合、抵抗性品種ではクチクラ層に菌が侵入後にただちに過敏感細胞死が起こる一方、罹病性品種では菌が細胞壁に侵入すると同時に細胞壁の分解が始まることが明らかになった(Koga 1994).

いもち病菌に対して抵抗性を示す擬似病斑葉変異体 *cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* では、*PR1* および *PBZ1* が発現していることが明らかになっているが(Takahashi *et al.* 1999), 今までに、イネの擬似病斑葉変異体において *PR* 遺伝子の発現を調査した報告は少ない. また、*cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* では、自家蛍光物質が葉鞘細胞に蓄積していることが明らかになっているが(Takahashi *et al.* 1999), 他の擬似病斑葉変異体において自家蛍光物質が蓄積しているのかどうかは明らかにされていない.

そこで本章では、いもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示し、擬似病斑の発現程度と病害抵抗性程度の関係についてすでに明らかにしている *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* について、様々な病害抵抗性反応について調査した. まず、病害抵抗性の指標として知られている自家蛍光物質が(Hammond-Kosack and Jones 1996), *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* の植物体内で蓄積しているかどうか調査した. 次に、病害抵抗性関連遺伝子 (pathogenesis-related, PR) である *PR1*, *PBZ1* およびキチナーゼ (*Ch13*) の発現を解析した.

2 材料および方法

[自家蛍光物質の検出]

自家蛍光物質の検出には、葉身に擬似病斑が見られる播種後 14 週目の植物の葉鞘を用いた. 自家蛍光物質は 405-435nm の excitation filter を用いて蛍光顕微鏡 (IMT-2 および IMT2-RFL, オリンパス, 東京) で観察した. いもち病菌の培養法は II 章と同じである. いもち病菌はレース 007 (Ina86-137) を用い、レース 007 に対する罹病性

品種としてヒノヒカリを、抵抗性品種としてとりで1号(抵抗性遺伝子 *Piz-t* を持つ)を用いた。葉鞘向軸面接種方法はIII章と同じである。

[ノーザン解析]

Total RNA は TRIzol 試薬(Life Technologies, Inc., Frederick, MD) を用いて葉身から抽出した。1レーンあたり 15 マイクログラムの Total RNA を1%のホルムアルデヒドのゲルを用いて電気泳動で分離し、ナイロンメンブレンに転写した。*PBZ1* (accession number D38170, EMBL database) に対応する cDNA 断片は *Spl12* の葉身由来の cDNA から PCR で増幅した(Midoh and Iwata 1996, 1997, Takahashi *et al.* 1999)。*PRI* (accession number U89895, EMBL database) に対応する cDNA 断片は wild-type の葉身由来の DNA から遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR で増幅した(Midoh and Iwata 1996, 1997, Takahashi *et al.* 1999)。

[RT-PCR 解析]

RT-PCR 解析は *Cht3* 特異的なプライマーを用いて行った(Nishizawa *et al.* 1993)。ポジティブコントロールとしてイネアクチン1遺伝子 (*Act1*) を用いた (McElroy *et al.* 1991)。アクチンプライマーの塩基配列は、5'-CATGCTATCCCTCGTCTCGACCT-3' と5'-CGCACTTCATGATGGAGTTGTAT-3'である。PCRの反応は、ディネーチャーに95°Cで30秒、プライマーのアニーリングに55°Cに2分、伸長に72°Cで2分であった。反応産物は、1.2%のアガロース/TAEゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

3 結果および考察

1) 自家蛍光物質の蓄積

ヒノヒカリに親和性のいもち病菌レース 007 を葉鞘向軸面に接種した場合には、付着器が形成され、付着器から多数の菌糸が隣接する細胞まで伸展し(図 4-2A)、自家蛍光は見られなかった(図 4-2B)。一方、レース 007 に対して抵抗性遺伝子 *Piz-t* を持つとりで1号にレース007を接種したところ、42時間後にはいもち病菌の付着器は形成されていたが菌糸は伸展せず(図 4-2C)、細胞死を示す細胞内で自家蛍光が確認された(図 4-2D)。従って、自家蛍光物質の蓄積は病害抵抗性を示す指標となりうると考えられた。そこで、*spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* の葉鞘細胞で自家蛍光物質が蓄積しているかどうか調査したところ、いずれの変異体においても病原菌を接種していない状態で自家蛍光物質が蓄積していたが、各々の原品種では自家蛍光物質

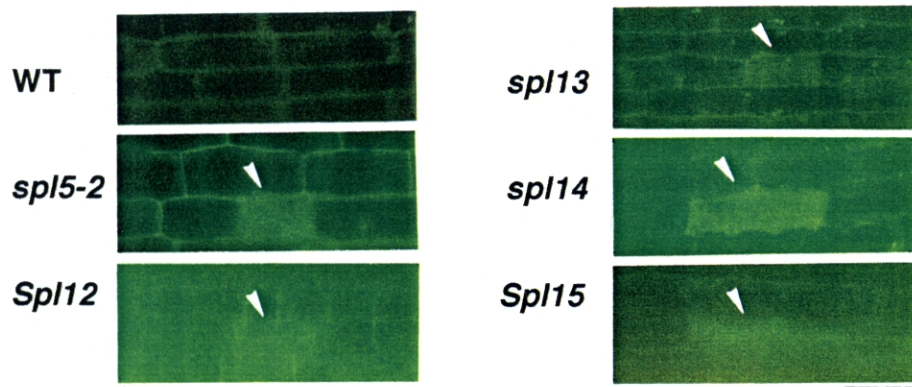


図 4-1. *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14*, *Spl15* および原品種 (WT) の葉鞘における自家蛍光物質の蓄積. WT は台中 65 号. 他の原品種 (ヒノヒカリおよびコシヒカリ) も台中 65 号と同様に自家蛍光物質が見られなかった. 播種後 14 週目の葉鞘の表皮細胞を UV 光 (405-435nm) で観察. バーは 50 μ m.

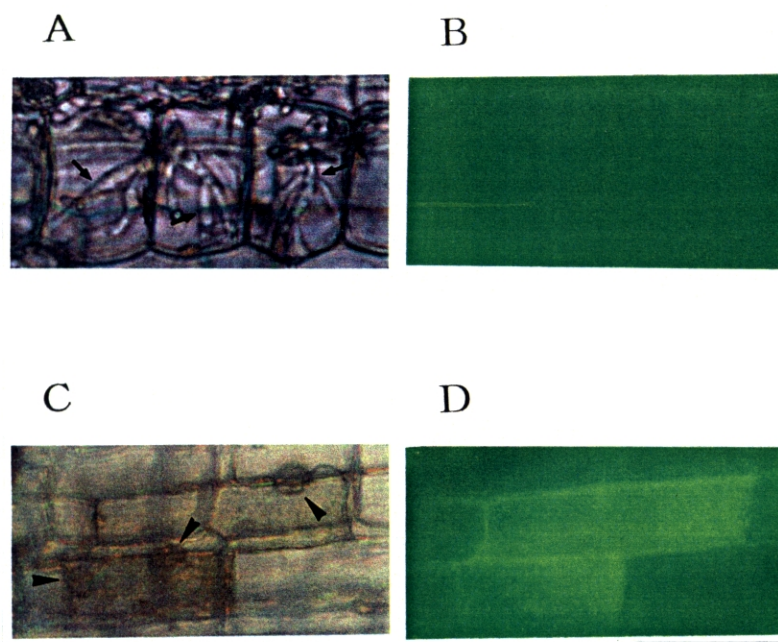


図 4-2. いもち病菌の葉鞘向軸面 (裏面) 接種 42 時間後の菌糸の伸展程度および自家蛍光物質の蓄積. A, B: 親和性菌 (罹病性品種のヒノヒカリにレース 007) を接種. C, D: 非親和性菌 (抵抗性品種のとりで1号にレース 007) を接種. A, C: 菌糸の進展. B, D: 自家蛍光物質の蓄積. 矢頭は付着器, 矢印は菌糸を示す. バーは 50 μ m.

は蓄積していなかった(図 4-1). 従って, *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* では少なくとも葉身に擬似病斑が見られるステージにおいては, 自家蛍光物質が恒常的に蓄積し病害抵抗性を示すということが明らかになった.

今までに, シロイヌナズナとイネの擬似病斑葉変異体において自家蛍光物質が恒常的に蓄積していることが報告されている. シロイヌナズナの擬似病斑葉変異体の *acd2* においては, 自発的な病斑が表れている葉, 親和性または非親和性菌を接種後の葉のいずれにおいても, 葉の柵状柔細胞の細胞壁に自家蛍光物質の蓄積が見られたが, 野生型では, 非親和性菌を接種後の葉にのみ自家蛍光物質の蓄積が認められた(Greenberg *et al.* 1994). また, *lsd1*, *Lsd2*, *lsd3* および *Lsd4* では, 葉肉で自家蛍光物質およびカロースの蓄積が見られ, *lsd5* では葉の表皮細胞層で自家蛍光物質およびカロースの蓄積が見られた (Dietrich *et al.* 1994). イネの擬似病斑葉変異体であり, いもち病抵抗性を示す *cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* においては葉鞘細胞に自家蛍光物質が蓄積していることが報告されている (Takahashi *et al.* 1999). これらの擬似病斑葉変異体における自家蛍光物質の働きについては不明の点が多いが, トマトとシロイヌナズナにおいては, 非親和性の糸状菌や細菌に対する過敏感反応として細胞壁が変質して蛍光を発することが明らかになり, この蛍光物質はクロスリンクしたフェノール化合物であり, 細胞壁を強くすることに働いていると推定されている (Schroder *et al.* 1992, Yu *et al.* 1993). 従って, 恒常的に自家蛍光物質が蓄積していることが明らかになった *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* では, 自家蛍光物質が蓄積することにより細胞壁が強化され, 病害抵抗性が誘導されている可能性が示唆された.

2) *PR1*, *PBZ1* の発現

spl5-2, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* 変異体を用いて, 病害抵抗性関連遺伝子 (pathogenesis-related, PR) である *PR1* および *PBZ1* の発現をノーザン解析した.

播種後 10 週目の原品種ヒノヒカリの葉では, *PR1* および *PBZ1* の発現がいずれも見られなかった(図 4-3). また, 他の原品種である台中 65 号およびコシヒカリにおいても *PR1* および *PBZ1* の発現が見られなかった(データ省略). また, 播種後 1 週目および 2 週目のいずれの原品種の葉でも, *PR1* および *PBZ1* の発現は見られなかった(データ省略).

spl5-2, *Spl12* および *Spl15* での発現パターンは似ていた(図 4-3). *spl5-2* では, 播種後 10 週目の葉(擬似病斑あり)で *PR1* および *PBZ1* が強く発現していた(図 4-3). 一方, 播種後 2 週目のまだ擬似病斑の出していない葉では, *PR1* および *PBZ1* の発現

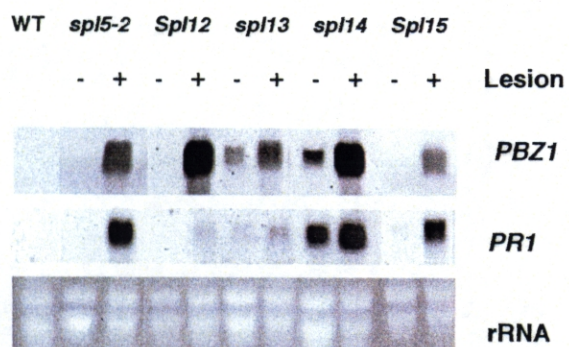


図 4 - 3. *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14*, *Spl15* および原品種 (WT:ヒノヒカリ) での *PR1*, *PBZ1* の発現. 播種後 1 又は 2 週目の擬似病斑の現れていない葉(-)および播種後 10 週目の擬似病斑の現れている葉(+)から全 RNA を抽出した. 他の原品種 (台中 65 号およびコシヒカリ) もヒノヒカリと同じ発現パターンを示した. 全 RNA は 1 レーンあたり 15 μ g を泳動.

が誘導されていなかった(図4-3). *Spl12*では, *PR1*の発現量は低いものの, 播種後10週目の葉(擬似病斑あり)で *PR1* および *PBZ1* が発現していた(図4-3). 播種後1週目のまだ擬似病斑の出ていない葉では, *PR1* および *PBZ1* の発現が誘導されていなかった(図4-3). *Spl15*では, 播種後10週目の葉(擬似病斑あり)で *PR1* および *PBZ1* が強く発現していたが, 播種後1週目のまだ擬似病斑の出ていない葉では, *PR1* および *PBZ1* の発現が誘導されていなかった(図4-3).

一方, *spl13* および *spl14* での発現パターンは, *spl5-2*, *Spl12* および *Spl15* と異なっていた(図4-3). *spl13* では, *PR1* の発現量は低いものの, 播種後10週目の葉(擬似病斑あり)と同様に播種後2週目のまだ擬似病斑の出ていない葉でも *PR1* および *PBZ1* が発現していた(図4-3). *spl14*では, 播種後10週目の葉(擬似病斑あり)と同様に播種後2週目のまだ擬似病斑の出ていない葉でも *PR1* および *PBZ1* が強く発現していた(図4-3).

従って, *PR1* および *PBZ1* は, *spl5-2*, *Spl12* および *Spl15* では, 擬似病斑の現れた後で発現が誘導されたが, *spl13* および *spl14* では, 擬似病斑の現れる前から発現が見られることが明らかになった. *spl13* および *spl14* では, 擬似病斑の現れる前から病害抵抗性が誘導されており, *PR1* および *PBZ1* は, 病害抵抗性が誘導されている時に発現していることが明らかになった.

今までに, シロイヌナズナとイネの擬似病斑葉変異体において病害抵抗性関連遺伝子が発現していることが報告されている. シロイヌナズナの擬似病斑葉変異体である *acd2*, *lsd1*, *Lsd2*, *lsd3*, *Lsd4* および *lsd5* では *PR1* の発現, *Acd6* では *PR1*, *GST1*(*Glutathion S-Transferase 1*) および *AIG1*(*Avr-Induced Gene 1*) の発現, *Lsd6* および *Lsd7* では *PR1*, *PR2* および *PR5* の発現が各々誘導されており, またいずれの変異体でも病害抵抗性が誘導されていた(Dietrich *et al.* 1994, Greenberg *et al.* 1994, Weymann *et al.* 1995, Rate *et al.* 1999). また, イネの擬似病斑葉変異体のうち, *cdr1*, *cdr2*, *Cdr3* および *spl11* では *PR1* および *PBZ1* の発現が誘導されており, いずれも病害抵抗性が誘導されていることが報告されている(Takahashi *et al.* 1999, Yin *et al.* 2000). *spl11* では擬似病斑が現れる前の *PR1* および *PBZ1* の発現の有無は調べられていないため, 本実験で供試した擬似病斑葉変異体と発現パターンを比較することはできなかった. *cdr1*では *PR1* および *PBZ1* のいずれも擬似病斑が現れる前には発現していなかったため, *spl5-2*, *Spl12* および *Spl15* の発現パターンと似ていた. これらはいずれも擬似病斑が現れた後で病害抵抗性が誘導されているという共通点もあった(Takahashi *et al.* 1999). *cdr2* および *Cdr3* では, *PR1* は擬似病斑が現れる前から発現

していたが、*PBZ1* は擬似病斑が現れる前には発現しておらず、本実験で供試した擬似病斑葉変異体とは発現パターンが異なっていた(Takahashi *et al.* 1999). しかし、*Cdr3* は擬似病斑が現れる前からもち病抵抗性が誘導されており、Ⅲ章において擬似病斑の現れる前からもち病および白葉枯病抵抗性が誘導されていることが明らかになった *spl13* および *spl14* と、病害抵抗性と擬似病斑の関係が似ていた。従って、*spl13* および *spl14* は擬似病斑の有無に関わらず、恒常的に病害抵抗性関連遺伝子が発現し、病害抵抗性が誘導されている可能性が示唆された。

シロイヌナズナの擬似病斑葉変異体 *acd2* では擬似病斑を示さない葉においても *PR1*, *PR2* および *PR5* の発現が誘導され、サリチル酸およびサリチル酸 β グルコシドも同様に発現が誘導されており、全身獲得抵抗性(SAR)が誘導されていると考えられた(Greenberg *et al.* 1994). 本実験においては、擬似病斑の存在が認められる植物体の擬似病斑を示さない葉における *PR1* および *PBZ1* の発現については調査していないので、同じような現象が起きているのかどうかはわからなかった。シロイヌナズナでは、*PR* 遺伝子を恒常的に発現する変異体 *cpr1* および *cpr5* は病害抵抗性が誘導され、内生のサリチル酸量が増えていた(Bowling *et al.* 1994, 1997). 従って、本実験で供試した病害抵抗性を示す擬似病斑葉変異体においても、*cpr1* および *cpr5* 変異体と同じように内生のサリチル酸量が増えている可能性も考えられた。

3) キチナーゼの発現

sp15-2, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* において、病害抵抗性関連遺伝子(pathogenesis-related, PR)であるキチナーゼ(*Cht3*)の mRNA の発現パターンを RT-PCR 法により解析した。

Cht3 はノーザンブロット解析では検出するのが難しかったので、RT-PCR 法により *Cht3* の発現を調査した。その結果、*Cht3* の発現パターンは *PR1* および *PBZ1* の発現パターンと似ていることがわかった(図 4-4)。

原品種のヒノヒカリ、台中 65 号およびコシヒカリは播種後 2, 8, 12 週目のいずれも、*Cht3* の発現は非常に低かった(図 4-4)。

sp15-2, *Spl12* および *Spl15* の葉では、*Spl15* の播種後 1 週目の擬似病斑の無い葉でも若干の発現が見られたが、全体的には擬似病斑の現れた後で *Cht3* の発現が認められた(図 4-4)。

一方、*spl13* および *spl14* では、擬似病斑の有無に関わらず、播種後 2, 8, 12 週目の葉での発現が見られた(図 4-4)。

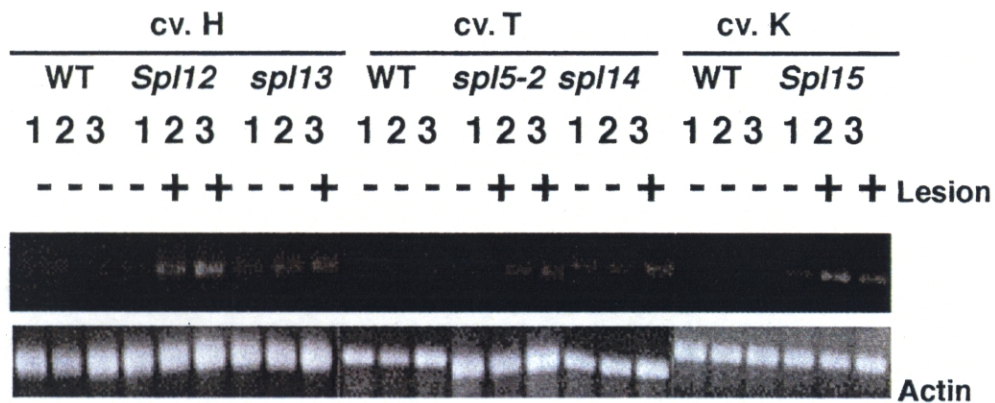


図4-4. *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14*, *Spl15* および各々の原品種での *Cht3*mRNA の RT-PCR による検出. 全 RNA は擬似病斑の現れていない葉(-), 擬似病斑の現れている葉(+)から抽出した. レーン1:播種後1又は2週目, レーン2:播種後8週目, レーン3:播種後12週目. アクチンはコントロール.

従って、キチナーゼは *PR1* および *PBZ1* と同様に、*spl5-2*, *Spl12* および *Spl15* では、擬似病斑の現れた後で発現が誘導されるが、*spl13* および *spl14* では、擬似病斑の現れる前から発現が誘導されていることが明らかになった。*spl13* および *spl14* では、擬似病斑の現れる前から病害抵抗性が誘導されており、キチナーゼは、病害抵抗性が誘導されている時に発現していることが明らかになった。

今までに、イネの擬似病斑葉変異体ではキチナーゼ遺伝子の発現については調べられていない。しかし、植物の防御遺伝子であるキチナーゼ遺伝子は微生物やウイルスなどの病原体の感染に応答して発現が誘導され、微生物の細胞壁を分解してその生育を阻害するだけでなく、微生物の細胞壁多糖を分解してオリゴ糖エリシターに変換することによって植物の生体防御遺伝子の発現を誘導していると考えられている(長田と内宮 1995)。実際に、イネで単離されている *Cht1*, *Cht2*, *Cht3* のうち(西澤ら 1992), *Cht2* あるいは *Cht3* をイネで過剰発現させることにより、いもち病抵抗性が誘導されることが明らかになった(Nishizawa *et al.* 1999a)。また、ストレスにより誘導されるイネの 1,3;1,4- β グルカナーゼ遺伝子をイネで過剰発現させる組換え体では、いもち病抵抗性が誘導されるとともに病原菌の感染なく擬似病斑葉が生じ、その際には *PR1* および *PBZ1* 遺伝子の発現が誘導されていることがわかった(Nishizawa *et al.* 2003)。本実験においては、*spl5-2*, *Spl12* および *Spl15* は、擬似病斑が現れ病害抵抗性が誘導された後に *PR1*, *PBZ1* および *Cht3* が発現していた。一方、擬似病斑の現れる前から病害抵抗性が誘導されていた *spl13* および *spl14* では、擬似病斑の現れる前から *PR1*, *PBZ1* および *Cht3* が発現していた。従って、擬似病斑葉変異体における病害抵抗性関連遺伝子の発現と病害抵抗性が強く相関していることが明らかになった。

V 擬似病斑葉突然変異体の実用品種への戻し交配系統の

農業形質の評価

1 緒言

日本におけるイネの重要な病害としては、いもち病、白葉枯病、紋枯病などが挙げられる。なかでも、最も重要な病害はいもち病であり、冷夏ではいもち病が大発生し、冷害の大きな原因の一つになっている。従って、いもち病抵抗性の強化が育種目標の中心となっている。レース特異性を示す真性抵抗性遺伝子を導入した「クサブエ」(*Pik* 遺伝子), 「レイハウ」(*Pita-2* 遺伝子)などでは、抵抗性遺伝子を侵すことが可能な病原菌が新たに発生し、抵抗性が崩壊した(井辺 2002)。従って、近年では圃場抵抗性遺伝子の利用が中心になっている。しかし、品種の育成には多くの時間を要する。また、各種の真性抵抗性遺伝子をもつ複数の準同質遺伝子系統(NILs)からなる品種(マルチライン)の育成が進められ、宮城県古川農業試験場(指定試験)が育成した「ササニシキ BL」が実用化されている(井辺 2002)。「ササニシキ BL」は *Pii*, *Pik*, *Pik-m*, *Piz*, *Pita*, *Pita-2*, *Piz-t* および *Pib* を各々持つ 8 系統から構成され、これは遺伝子型の異なる系統の混合やローテーションにより抵抗性の崩壊を避けて、真性抵抗性を利用するもので、「ササニシキ BL」以外にも「コシヒカリ」「キヌヒカリ」「ミネアサヒ」などの NILs が選抜され登録されつつあるが(井辺 2002)、育成に時間がかかる点や採種に手間がかかる点などの問題があり、現時点ではマルチラインの普及はあまり進んでいない。最近では、マーカー育種を目標として、陸稲や外国稲などの圃場抵抗性遺伝子のマッピングが進められている。

白葉枯病は、細菌病の一つで、水によって伝播し風などによりイネが傷を受けると、そこから導管部に侵入する(櫛渕 1992)。近年は、圃場の基盤整備により発生が少なくなったものの、台風などにより大発生する(櫛渕 1992)。真性抵抗性遺伝子のブレークダウンが見られてからは、圃場抵抗性の強化がなされ、「あそみのり」などの抵抗性品種が育成されたが(櫛渕 1992)、食味の向上が課題となっている。

紋枯病は検定が難しく、草型に抵抗性が左右され、分けつの少ない品種が紋枯病に強い傾向がある点から、紋枯病抵抗性品種の育成はほとんど行われていない。最近、イネ紋枯病抵抗性系統の *WSS2* の有する抵抗性遺伝子に関する QTL 解析が行われた(佐藤ら 2003)。

現在、減農薬による環境負荷が少なく安心・安全なコメづくりが強く求められており、

複数の病害に対する抵抗性を高めることが大きな育種目標となっている。イネの擬似病斑葉変異体のうち、複数の病害に抵抗性を示すことが報告されているのは、*spl11* と M1009 である(表 2-1)。*spl11* はいもち病および白葉枯病に対してレース非特異的な抵抗性を示し(Yin *et al.* 2000), M1009 はいもち病菌およびごま葉枯病に抵抗性を示した(Arase *et al.* 2000)。しかしながら、これらの変異体の育種的な利用の可能性については検討されていない。

III章では、一部の擬似病斑葉変異体において、いもち病および白葉枯病に対してレース非特異的な抵抗性が誘導されていることを明らかにした。また、IV章ではそれらの擬似病斑葉変異体内では自家蛍光物質が蓄積し、病害抵抗性関連遺伝子(pathogenesis-related, PR)である *PR1*, *PBZI* およびキチナーゼが発現していることを明らかにした。しかしながら、II章で示したとおり、これらの擬似病斑葉変異体は、稈長、穂数、および一株あたりの籾重が原品種より少ない系統が多い。

そこで、本章ではこれらの擬似病斑葉変異体を実用品種に戻し交配を行うことにより、農業形質がどの程度改良できるか検討を行った。

2 材料および方法

新しく見出した擬似病斑葉変異体のうち、*spl13*, *spl14*, *Spl15*, および *spl5-2* について戻し交配を行った。*spl13*, *spl14* および *spl5-2* はヒノヒカリと、*Spl15* はその原品種であるコシヒカリと交配し、それらの F₂ 個体の中で病斑葉突然変異遺伝子をホモにもつ個体を判別し、それらの中で、農業形質の改良されたと思われる個体をヒノヒカリ又はコシヒカリと交配し、その F₂ 個体 (BC₁F₂) を圃場に展開し、病斑葉突然変異遺伝子をホモにもつ個体とヒノヒカリ又はコシヒカリを比較した。翌年、それらの個体の中で、農業形質の改良されたと思われる個体から得た自殖系統(BC₁F₃)とヒノヒカリ又はコシヒカリを比較して、遺伝子の固定の程度を調査した。*Spl15* は優性の突然変異であるため BC₁F₂ では *Spl15* をホモに持っているかヘテロなのかは判別できなかった。農業形質として、稈長、穂長、一株あたりの穂数、一株あたりの籾重および籾百粒重を各系統あたり 10 個体調査した。*Spl15* は一株あたりの籾数が少ないため、籾 50 粒の重さを調査して、籾百粒重を求めた。

BC₁F₂ は 2001 年に、BC₁F₃ は 2002 年に九州沖縄農業研究センターの水田で材料を養成した。2001 年は 6 月 1 日に播種、6 月 20 日に移植、2002 年は 5 月 30 日に播種、6 月 20 日に移植、いずれも基肥に緩効性肥料で N・P・K を各々 0.8kg/a を施した。

3 結果および考察

1) BC₁F₂の農業形質

spl13 は、原品種のヒノヒカリと比較し、稈長、穂長、一株穂数、一株籾重および籾百粒重のいずれも低く、特に稈長および一株籾重が低かった(表 5-1)。4つの BC₁F₂ 系統 ((ヒノヒカリ/*spl13*/ヒノヒカリ)F₂)F₂) から擬似病斑葉を示す個体を各々から7~13個体得て、調査した。稈長はいずれも *spl13* より長く、ヒノヒカリと同程度であった(表 5-1)。穂長はいずれも *spl13* より長い、ヒノヒカリよりやや短かった(表 5-1)。一株穂数は *spl13* より多いが、ヒノヒカリより多い系統が1つと、ほぼヒノヒカリと同程度の系統が3つに分かれた(表 5-1)。一株籾重は、一株穂数の最も多い系統でヒノヒカリと同程度であったが、残りの系統では *spl13* より重い、ヒノヒカリより軽かった(表 5-1)。籾百粒重はいずれも *spl13* より重かったが、ヒノヒカリより重い系統が1つと、同程度の系統が2つと、軽い系統が1つに分かれた(表 5-1)。一株籾重の標準偏差が大きく、系統内での個体間のばらつきが大きかった(表 5-1)。

spl5-2 は、原品種は台中65号であるが、台中65号より、稈長、穂長、一株穂数および一株籾重のいずれも低かった(表 2-8)。ヒノヒカリと比較すると、籾百粒重はやや重いが、稈長、穂長、一株穂数、および一株籾重はいずれも低く、特に一株籾重が軽かった(表 2-8)。2つの BC₁F₂ 系統 ((ヒノヒカリ/*spl5-2*/ヒノヒカリ)F₂)F₂) から擬似病斑葉を示す個体を各々から3~7個体得て、調査した。稈長および穂長はいずれもヒノヒカリより短く、*spl5-2* とほぼ同程度であった(表 5-1)。一株穂数は *spl5-2* よりやや少なくなっていた(表 5-1)。一株籾重は、ヒノヒカリより軽く、*spl5-2* とほぼ同程度であった(表 5-1)。籾百粒重は *spl5-2* より軽く、さらにヒノヒカリより軽い系統1つと、ヒノヒカリと同程度の系統1つに分かれた(表 5-1)。一株籾重の標準偏差が大きく、系統内での個体間のばらつきが大きかった(表 5-1)。

spl14 は、原品種の台中65号と比較し、穂長は同程度であるが、稈長、一株穂数および一株籾重は低かった(表 2-8)。ヒノヒカリと比較し、稈長および穂長はやや長く、一株穂数および一株籾重は低く、籾百粒重はほぼ同程度で、特に一株籾重が軽かった(表 5-1)。2つの BC₁F₂ 系統 ((ヒノヒカリ/*spl14*/ヒノヒカリ)F₂)F₂) から擬似病斑葉を示す個体を各々から10~11個体得て、調査した。稈長は *spl14* とヒノヒカリより長くなっていた(表 5-1)。穂長はヒノヒカリより長い系統が1つと同程度の系統は1つであった(表 5-1)。一株穂数は *spl14* より多く、ヒノヒカリと同程度であった(表 5-1)。一株籾重は *spl14* より極めて重く、ヒノヒカリと同程度になっていた(表 5-1)。籾百粒重はヒノヒカリと同程度の系

表 5-1. 擬似病斑葉突然変異体の戻し交配系統 (BC₁F₂) の農業形質

系統名	個体数	稈長(cm)	穂長(cm)	一株穂数(本)	一株粉重(g)	粉百粒重(g)
<i>sp113</i>	10	50.2±4.1**	14.4±0.7**	13.1±0.9**	12.8±0.8**	2.1±0.1**
(<i>レ</i>)/(<i>sp113</i> (<i>レ</i>))F ₂ -1	13	79.3±2.9	17.9±1.3*	19.6±3.4*	36.0±7.3	2.5±0.1*
(<i>レ</i>)/(<i>sp113</i> (<i>レ</i>))F ₂ -2	9	81.2±2.7	17.1±1.4**	18.4±3.8	31.1±5.8**	2.5±0.0
(<i>レ</i>)/(<i>sp113</i> (<i>レ</i>))F ₂ -3	8	78.4±3.9	17.2±1.0**	16.5±2.5	29.3±3.9**	2.4±0.1
(<i>レ</i>)/(<i>sp113</i> (<i>レ</i>))F ₂ -4	7	78.4±4.5	17.4±0.8**	15.4±3.1	25.6±7.4**	2.3±0.1*
<i>sp15-2</i>	10	(68.3±2.3)	(16.7±1.3)	(15.5±2.2)	(15.5±2.4)	(2.5±0.1)
(<i>レ</i>)/(<i>sp15-2</i> (<i>レ</i>))F ₂ -1	3	70.3±5.5**	17.1±0.6**	13.3±4.0	18.1±6.4**	2.4±0.1
(<i>レ</i>)/(<i>sp15-2</i> (<i>レ</i>))F ₂ -2	7	69.3±4.2**	16.3±2.3**	13.6±1.1**	17.7±4.1**	2.2±0.2*
<i>sp114</i>	10	(80.6±3.2)	(21.7±1.5)	(14.0±3.4)	(22.0±4.8)	(2.3±0.1)
(<i>レ</i>)/(<i>sp114</i> (<i>レ</i>))F ₂ -1	11	85.4±5.6**	20.1±1.4**	17.3±2.6	33.5±9.0	2.4±0.3
(<i>レ</i>)/(<i>sp114</i> (<i>レ</i>))F ₂ -2	10	88.4±6.2**	19.2±2.5	16.5±2.4	32.4±9.9	2.3±0.2*
ヒノヒカリ	10	78.0±4.7	18.8±0.7	16.8±2.2	37.6±4.4	2.4±0.1
<i>Sp115</i>	10	58.5±3.2**	18.1±1.0**	10.5±2.7**	9.5±2.2**	2.0±0.1**
(<i>コシ</i>)/(<i>Sp115</i> (<i>コシ</i>))F ₂ -1	16	76.6±6.2**	19.8±0.9	13.3±4.3**	23.9±9.7**	2.7±0.1
(<i>コシ</i>)/(<i>Sp115</i> (<i>コシ</i>))F ₂ -2	11	77.6±6.4*	18.2±1.8*	13.7±5.4*	22.1±11.2**	2.6±0.1
コシヒカリ	10	82.6±4.9	19.9±1.9	17.8±2.9	35.6±6.0	2.6±0.1

1) 戻し交配親に対して, **は1%有意, *は5%有意.

系統1つと軽い系統が1つであった(表 5-1). 一株籾重の標準偏差が極めて大きく, 系統内での個体間のばらつきが極めて大きかった(表 5-1).

Spl15 は, 原品種のコシヒカリと比較し, 稈長, 穂長, 穂数, 一株籾重および籾百粒重のいずれも低く, 特に稈長および一株籾重が極めて低かった(表 2-8). 2つの BC_1F_2 系統 ((コシ/*Spl15*/コシ) F_2) F_2) から擬似病斑葉を示す個体を各々から 11~16 個体得て, 調査した. *Spl15* は優性の突然変異であるため BC_1F_2 では *Spl15* をホモに持っているかヘテロなのかは判別できなかった. 稈長は *Spl15* より長くコシヒカリより短かった(表 5-1). 穂長はコシヒカリと同程度の系統1つと, やや短い系統1つであった(表 5-1). 一株穂数は *Spl15* より多いがコシヒカリより少なかった(表 5-1). 一株籾重はコシヒカリより軽かったが, *Spl15* より極めて重くなっていた(表 5-1). 籾百粒重は *Spl15* より重くコシヒカリと同程度であった(表 5-1). 一株籾重の標準偏差が極めて大きく, 系統内での個体間のばらつきが極めて大きかった(表 5-1).

本実験において, *spl13*, *spl14*, *Spl15* および *spl5-2* のいずれも一株籾重が各々の原品種より軽くなっていたが, 戻し交配を行うことにより *spl13*, *spl14* および *Spl15* では反復親と同程度またはやや少ない程度まで回復していた. 従って, *spl13*, *spl14* および *Spl15* においては *Spl* 遺伝子座とは異なる別の遺伝子に生じた突然変異により一株籾重などが減少していた可能性が示唆された. また, *spl13* および *Spl15* は稈長および一株穂数, *spl14* は一株穂数が戻し交配により反復親に近づくことにより一株籾重が増えたと考えられる. 一方, *spl5-2* の戻し交配系統では, 稈長, 穂長, 穂数, 一株籾重および籾百粒重のいずれも *spl5-2* とほとんど変わらなかった. 従って, *spl5-2* においては, *spl5-2* 遺伝子が植物体の矮化に関して多面発現している可能性や, 擬似病斑による光合成の低下が矮化をもたらしている可能性が示唆された.

2) BC_1F_3 の農業形質

BC_1F_3 の農業形質について, 各々 10 個体を調査した.

spl13 について, 2つの BC_1F_3 系統 ((ヒ/*spl13*/ヒ) F_2) F_3) について調査した. BC_1F_3 では BC_1F_2 より稈長, 穂長, 一株穂数および一株籾重の標準偏差が小さくなっており遺伝的に固定が進んだことが示唆された(表 5-1, 表 5-2). 籾百粒重は BC_1F_3 では BC_1F_2 に比べて, ヒノヒカリより有意に軽くなっていた(表 5-1, 表 5-2). BC_1F_3 の稈長はいずれも *spl13* より長く, ヒノヒカリと同程度の系統1つと短い系統1つであった(表 5-2). 穂長はいずれも *spl13* より長い, ヒノヒカリより短かった(表 5-2). 一株穂数はヒノヒカリと同程度であった(表 5-2). 一株籾重は, *spl13* より重い, ヒノヒカリよりは軽

表 5-2. 擬似病斑葉突然変異体の戻し交配系統 (BC₁F₃) の農業形質

系統名	稈長(cm)	穂長(cm)	一株穂数(本)	一株粒重(g)	籾百粒重(g)
<i>sp113</i>	46.3 ± 1.7**	13.9 ± 0.9**	7.6 ± 1.9**	7.2 ± 1.6**	2.2 ± 0.1**
(<i>t</i>)/(<i>sp113</i> / <i>t</i>)(F ₂)F ₃ -1	77.5 ± 2.0	16.6 ± 1.2**	15.9 ± 1.6	25.1 ± 3.2**	2.4 ± 0.1**
(<i>t</i>)/(<i>sp113</i> / <i>t</i>)(F ₂)F ₃ -2	74.6 ± 1.8**	15.8 ± 0.7**	15.6 ± 2.6	25.2 ± 4.4**	2.4 ± 0.1**
<i>sp15-2</i>	(76.4 ± 2.1)	(18.4 ± 0.9)	(12.3 ± 3.2)	(18.4 ± 4.0)	(2.6 ± 0.1)
(<i>t</i>)/(<i>sp15-2</i> / <i>t</i>)(F ₂)F ₃ -1	65.0 ± 2.1**	17.3 ± 1.3**	16.3 ± 4.2	23.0 ± 4.6**	2.3 ± 0.1**
(<i>t</i>)/(<i>sp15-2</i> / <i>t</i>)(F ₂)F ₃ -2	69.2 ± 3.2**	16.4 ± 0.9**	16.7 ± 3.3	19.8 ± 3.6**	2.4 ± 0.1**
<i>sp114</i>	(82.8 ± 1.8)	(22.1 ± 0.9)	(9.9 ± 1.3)	(17.7 ± 3.0)	(2.3 ± 0.1)
(<i>t</i>)/(<i>sp114</i> / <i>t</i>)(F ₂)F ₃ -1	84.9 ± 5.6**	19.0 ± 1.0	15.6 ± 3.5	22.7 ± 5.9**	2.2 ± 0.1**
(<i>t</i>)/(<i>sp114</i> / <i>t</i>)(F ₂)F ₃ -2	80.4 ± 3.0	20.0 ± 1.0	16.0 ± 2.8	26.9 ± 8.3	2.1 ± 0.1**
ヒノヒカリ	79.2 ± 3.9	19.4 ± 1.6	15.2 ± 2.4	30.4 ± 3.5	2.6 ± 0.1
<i>Sp115</i>	48.2 ± 2.8**	16.9 ± 1.6**	5.7 ± 2.1**	4.7 ± 1.8**	2.0 ± 0.1**
(<i>コシ</i>)/(<i>Sp115</i> / <i>コシ</i>)(F ₂)F ₃ -1	82.2 ± 2.9**	20.3 ± 1.1	15.2 ± 2.2	29.4 ± 4.1**	2.6 ± 0.0
コシヒカリ	86.9 ± 2.9	21.4 ± 2.0	16.8 ± 1.6	38.4 ± 5.6	2.6 ± 0.2

1) 各 10 個体を調査.

2) 戻し交配親に対して, * *は 1 % 有意, *は 5 % 有意.

かった(表 5-2). 籾百粒重はいずれも *spl13* より重く、ヒノヒカリより軽かった(表 5-2). 従って、穂長、一株籾重および籾百粒重についてさらに改良を進めるためには、ヒノヒカリに戻し交配を進める必要があると思われた. 一株籾重がヒノヒカリと同程度の約30gの個体が、2つの BC_1F_3 系統内において、各々1個体存在しており、これらが交配母本に有望と思われた.

spl5-2 について、2つの BC_1F_3 系統 ((ヒノ)(*spl5-2*/ヒノ) F_2) F_3) について調査した. BC_1F_3 では BC_1F_2 より一株穂数および一株籾重が大きくなっており優良個体を選抜した効果が確認できた(表 5-1, 表 5-2). また、 BC_1F_3 では BC_1F_2 より稈長の標準偏差が小さくなっており遺伝的に固定が進んだことが示唆された(表 5-1, 表 5-2). BC_1F_3 の稈長および穂長はいずれも *spl5-2* およびヒノヒカリより短くなっていた(表 5-2). 一株穂数は *spl5-2* より多く、ヒノヒカリと同程度であった(表 5-2). 一株籾重は、ヒノヒカリより軽く、*spl5-2* よりやや重い程度であった(表 5-2). 籾百粒重は *spl5-2* およびヒノヒカリより軽くなっていた(表 5-2). 従って、稈長、穂長、一株籾重および籾百粒重についてさらに改良を進めるためには、ヒノヒカリに戻し交配を進める必要があると思われた(表 5-2). 一株籾重がヒノヒカリと同程度の約 30g の個体が、2つの BC_1F_3 系統内のうち、一株籾重の平均の高い系統((ヒノ)(*spl5-2*/ヒノ) F_2) F_3 -1)に2個体存在しており、これらが交配母本に有望と思われた.

spl14 について、2つの BC_1F_3 系統 ((ヒノ)(*spl14*/ヒノ) F_2) F_3) について調査した. BC_1F_3 では BC_1F_2 より穂長、一株籾重および籾百粒重の標準偏差が小さくなっており遺伝的に固定が進んだことが示唆された(表 5-1, 表 5-2). BC_1F_3 の稈長は1つの系統ではヒノヒカリとほぼ同程度で、もう1つの系統では *spl14* とヒノヒカリよりやや長くなっていた(表 5-2). 穂長および一株穂数はヒノヒカリと同程度であった(表 5-2). 一株籾重は、*spl14* より重い、ヒノヒカリと同程度の系統1つと、軽い系統1つであった(表 5-2). 籾百粒重はヒノヒカリより軽かった(表 5-2). 一株籾重の標準偏差がヒノヒカリよりやや大きく、まだ遺伝的に固定していない可能性が示唆された(表 5-2). 一株籾重および籾百粒重についてさらに改良を進めるためには、ヒノヒカリに戻し交配を進める必要があると思われた. 一株籾重がヒノヒカリと同程度の約 30g の個体が、2つの BC_1F_3 系統内において、各々2個体ずつ存在しており、これらが交配母本に有望と思われた.

Spl15 について、1つの BC_1F_3 系統 ((コシ)(*Spl15*/コシ) F_2) F_3) について調査した. *Spl15* は優性の突然変異であるが、 BC_1F_3 では *Spl15* をホモに持っている系統を判別した. BC_1F_3 では BC_1F_2 より稈長、穂長、一株穂数および一株籾重が大きくなっており優

良個体を選抜した効果が確認できた(表 5-1, 表 5-2). また, BC_1F_3 では BC_1F_2 より稈長, 一株穂数および一株籾重の標準偏差が小さくなっており遺伝的に固定が進んだことが示唆された(表 5-1, 表 5-2). BC_1F_3 の稈長は *Spl15* より長くコシヒカリより短かった(表 5-2). 穂長および一株穂数はコシヒカリと同程度であった(表 5-2). 一株籾重は *Spl15* より極めて重くなっていたがコシヒカリよりは軽かった(表 5-2). 籾百粒重は *Spl15* より重くコシヒカリと同程度であった(表 5-2). 標準偏差はいずれもコシヒカリとほぼ同程度であり, 遺伝的に固定が進んだことが示唆された(表 5-2). 従って, 稈長, 一株穂数, 一株籾重および籾百粒重についてさらに改良を進めるためには, コシヒカリに戻し交配を進める必要があると思われた. 一株籾重がコシヒカリと同程度の約 38g の個体が, BC_1F_3 系統内において, 1個体存在しており, これが交配母本に有望と思われた.

全体的に, BC_1F_3 系統では BC_1F_2 系統に比較し, 稈長, 穂長, 穂数および一株籾重の標準偏差が小さくなっており, 遺伝的に固定が進んだと考えられる. しかしながら, 一株籾重は BC_1F_3 系統と BC_1F_2 系統ではほぼ同程度であり, さらに戻し交配を行う必要があると考えられた.

戻し交配においては, 連続戻し交配で得られる個体の遺伝子型は, 反復親の遺伝子型にしたいに近づくが, 供与親の目的遺伝子と近接した染色体部分は連鎖により残ってしまう(鵜飼 2002). 統計的には 10 回の戻し交配後でも目的遺伝子の両側あわせて約 20cMが残ることになる(鵜飼 2002). 従って, いもち病真性抵抗性遺伝子に関する準同質遺伝子系統であるササニシキBL8 系統はいずれも 6~9 回戻し交配を行っているが, 反復親であるササニシキにより近い表現型を示す個体を用いて戻し交配を行っている.

本実験では, *spl13*, *spl14*, *Spl15* および *spl5-2* のいずれの戻し交配系統でも, BC_1F_3 では一株籾重が反復親のヒノヒカリ又はコシヒカリより小さく, さらに戻し交配を進めて改良を進める必要があると考えられた. また, 一株籾重が軽くなる原因として, *spl13* では穂長および籾百粒重, *spl5-2* では稈長, 穂長および籾百粒重, *spl14* では籾百粒重, *Spl15* では稈長, 一株穂数および籾百粒重が少ないことによると考えられた. 葉に病斑状の褐点が生じることにより開花後の登熟が不十分となり籾百粒重が少なくなっている可能性も考えられた. しかしながら, *spl13*, *spl14*, *Spl15* および *spl5-2* のいずれの戻し交配系統でも, BC_1F_3 での一株籾重が反復親のヒノヒカリ又はコシヒカリとほぼ同程度の個体が存在しており, 今後さらに戻し交配を進めることにより育種的に利用できる可能性が示唆された.

VI 総合考察

安定的な病害抵抗性品種を育成するためには、病害抵抗性を有する遺伝子源を探し、抵抗性のメカニズムを解明し、育種材料として活用していくことが重要である。そこで本研究では、病害抵抗性品種の開発に資することを目的として、擬似病斑葉変異体の病害抵抗性に関する育種学的解析を実施した。

第II章では、擬似病斑葉変異体の遺伝分析を行い各変異体の農業形質を調査した。また、擬似病斑の発生する時期と程度および器官について解析した。第III章では、擬似病斑葉変異体の病害抵抗性を調査し、擬似病斑の発現程度と病害抵抗性の関係について検討した。第IV章では、擬似病斑葉変異体における病害抵抗性関連遺伝子の発現について調査した。第V章では、擬似病斑葉変異体の実用品種への戻し交配系統の農業的評価を行った。

ここでは、イネにおける病害抵抗性の機構について考察し、病害抵抗性育種の方向性について整理することとする。

1 イネにおける病害抵抗性の機構

本研究で新たに同定した擬似病斑葉変異体 *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14*, *Spl15* および既知の *spl1*~*spl10* についてももち病および白葉枯病抵抗性検定を行い、罹病性の変異体と抵抗性の変異体にグループ分けを行った。罹病性であることが明らかになったのは、*spl1*, *spl2*, *spl3*, *spl6*, *spl8* および *spl9* である。これらの擬似病斑葉変異体においては、擬似病斑の発現を開始する葉位や大きさ、色などの共通点は無かった。また、葉身以外の器官での擬似病斑の発現についても様々であった。従って、*spl1*, *spl2*, *spl3*, *spl6*, *spl8* および *spl9* は様々な遺伝子の突然変異の結果として擬似病斑が生じている変異体であり、病害抵抗性のメカニズムについては変異が生じていないと考えられる。

一方、原品種より強い抵抗性を示すことが明らかになったのは *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* である。これらはいもち病抵抗性と白葉枯病抵抗性の両方に対する抵抗性が誘導されており、いずれかの病害のみに対して抵抗性が誘導されている変異体は無かった。他に、今までに病害抵抗性が誘導されていることが報告されている擬似病斑葉変異体としては *spl11*, *cdr1*, *cdr2*, *Cdr3* および M1009 がある。*cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* はいもち病に対する抵抗性のみ調査され

ているため、他の病害に対する抵抗性は明らかになっていないが(Takahashi *et al.* 1999), *spl11* はいもち病および白葉枯病に対してレース非特異的な抵抗性を示し(Yin *et al.* 2000), M1009 はいもち病およびごま葉枯病に抵抗性を示した(Arase *et al.* 2000). イネのいもち病に対する抵抗性としては、少数の主働遺伝子支配による質的な抵抗性を示す真性抵抗性と、量的な抵抗性を示す圃場抵抗性が知られている。真性抵抗性のメカニズムには遺伝子対遺伝子仮説があてはまることが知られている。遺伝子対遺伝子仮説は、宿主の抵抗性遺伝子に対応して特異的に作用する非病原性遺伝子が病原菌にあり、この対応する両遺伝子が組み合わさった時だけ補足作用として抵抗性が発現され、対応する抵抗性遺伝子と非病原性遺伝子のいずれか一方または両方が欠ける場合には、すべて罹病性になるという説である(Flor 1956, 八重樫と鳥山 1997). しかし, *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14*, *Spl15*, *spl11* および M1009 はいもち病以外の病害に対しても抵抗性を示すことから、これらの変異体に誘導されているメカニズムは特定の病害に対する真性抵抗性ではなく、複数の病害に共通の抵抗性反応が生じていると考えられる。

植物に病原菌が侵入すると、抵抗性反応として、様々な形態的あるいは生理的变化が生じる。代表的な形態的な変化としては、抵抗性の宿主が病原菌の感染を受けると、被侵入細胞が急速に反応して褐変壊死する過敏感反応がある。本研究において病害抵抗性を示した *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14*, *Spl15* には、擬似病斑が小さく、擬似病斑同士が連続しないで存在するタイプであるという共通点があった。従って、これらの変異体では病原菌が存在していないにも関わらず、過敏感反応が生じることにより病害抵抗性が誘導されていると考えられる。一方、擬似病斑の発生する器官については、変異体間での共通点は見出せなかった。従って、これらの変異体での変異遺伝子の発現制御は各々異なっていると考えられる。

本研究で新たに同定した擬似病斑葉変異体 *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* は、擬似病斑が現れた後に抵抗性が誘導される変異体と、擬似病斑が現れる前から抵抗性が誘導されている変異体にグループ分けされた。*spl5-2*, *Spl12* および *Spl15* は擬似病斑が現れた後にいもち病および白葉枯病に対する抵抗性が誘導されていた。従って、これらの変異体では擬似病斑という過敏感反応の結果として抵抗性が誘導されていると考えられる。一方, *spl13* および *spl14* では、擬似病斑の現れる前からいもち病および白葉枯病に対する抵抗性が誘導されていることが明らかになった。今までの報告では, *Cdr3* が擬似病斑が現れる前からいもち病抵抗性が誘導されていることが知られている(Takahashi *et al.* 1999). シロイヌナズナでは, *lsd1* 変異体が擬似

病斑の現れる前から病害抵抗性を示し、擬似病斑の誘導には superoxide が必要であり、superoxide が細胞死に先立って蓄積していた (Jabs *et al.* 1996). 従って, *spl13*, *spl14* および *Cdr3* でも擬似病斑が現れる前から superoxide などが蓄積し、病害抵抗性が誘導されている可能性が考えられる.

過敏感反応による形態的な抵抗性反応として、細胞壁の構造の変化が挙げられる。トマトとシロイヌナズナにおいては、非親和性の糸状菌や細菌に対する過敏感反応として細胞壁が変質して蛍光を発することが明らかになり、この蛍光物質はクロスリンクしたフェノール化合物であり、細胞壁を強くすることに働いていると推定されている (Schroder *et al.* 1992, Yu *et al.* 1993). *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* には自家蛍光物質の蓄積が確認された。また、いもち病抵抗性を示す *cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* においては葉鞘細胞に自家蛍光物質が蓄積していることが報告されている (Takahashi *et al.* 1999). 従って、これらの変異体では、自家蛍光物質が蓄積することにより細胞壁が強化され、病害抵抗性が誘導されていると考えられる。

植物の生理的な病害抵抗性反応として、ファイトアレキシンや PR タンパク質の生成がある。PR タンパク質とは、病原菌に感染した植物細胞が過敏感反応を起こし、病斑部およびその周辺部に新たに誘導されてくるタンパク質の総称で、植物の自己防御機構に関与していると考えられている (Flor 1956, 八重樫と鳥山 1997). サリチル酸による PR タンパク質などの発現誘導が起こらない変異体として *npr1* (nonexpresser of PR genes) および *nim1* が単離されこれらは同じ遺伝子座の変異によるとわかったが (Jirage *et al.* 2001), 最近シロイヌナズナの *NPRI/NIMI* 遺伝子のホモログをイネで単離しイネで過剰発現させたところ白葉枯病抵抗性を示し, *NPRI/NIMI* 遺伝子の病害抵抗性反応経路がシロイヌナズナとイネで保存されている可能性が示唆されている (Shimamoto and Kyozuka 2002). 本実験において、病害抵抗性が誘導されていた *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* では, *PR1*, *PBZ1* およびキチナーゼ遺伝子が発現していることが明らかになった。従って、イネにおいても PR タンパク質の発現が自己防御機構に関与していると考えられる。さらに、これらの変異体では複数の PR 遺伝子が発現していることから、病害抵抗性の誘導に働く遺伝子カスケードの比較的上流において遺伝子変異が生じることにより、複数の形態的および生理的な抵抗性反応が誘導されていると考えられる。

病害抵抗性が誘導されている擬似病斑葉変異体として報告されている *cdr1* と *cdr2* の培養細胞では, protein phosphatase1 の阻害剤処理を行った場合、野生型より多くの過酸化水素を産生した (Takahashi *et al.* 1999). 過酸化水素は細胞死の局所的な誘因

因子として作用することが知られており(Levine *et al.* 1994), oxidative burst は膜結合型の NADPH oxidase の活性化によるものである (Lamb and Dixon 1997). 従って, *cdr1*と*cdr2* は NADPH oxidase の活性化を引き起こす情報伝達経路で作用していると考えられた(Takahashi *et al.* 1999). 従って, 本研究において病害抵抗性が誘導されていた *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* においても NADPH oxidase の活性化を引き起こす情報伝達経路で作用している可能性が考えられる. 最近, *spl7* は高温や UV 光により擬似病斑葉の形成が誘導されること, およびその遺伝子産物は熱ストレスに関する転写因子 (HSF) と高い相同性があることが明らかにされている(Yamanouchi *et al.* 2002). 本実験では主に圃場で育成した擬似病斑葉変異体を解析に用いており, 各変異体の温度ストレスに対する応答は調査していないが, いくつかの擬似病斑葉変異体がいもち病と白葉枯病という異なる外的ストレスに対して抵抗性反応を示していることから, 温度ストレスなどの様々なストレス耐性も誘導している可能性が考えられる.

Rac GTPase は動物細胞でシグナル伝達系で働くことが知られているが, 様々な植物の抵抗性反応にも関係していることが明らかにされ, その推定されるアミノ酸配列からグループ I とグループ II に分けられることがわかっている(Shimamoto and Kyojuka 2002). イネにおいて, グループ II に属しヒトの Rac GTPase のホモログである OsRac1 を恒常的に活性型にした形質転換体は擬似病斑を示し, いもち病と白葉枯病に対して抵抗性を示す一方, 擬似病斑葉変異体 (*sl*) を dominant negative な Osrac1 にすると擬似病斑の発現が妨げられることが明らかにされた(Kawasaki *et al.* 1999, Ono *et al.* 2001). 従って, OsRac1 はイネにおける病害抵抗性に関する情報伝達系で働いていると考えられた(Kawasaki *et al.* 1999, Ono *et al.* 2001). また, 情報伝達経路で働くことが知られている三量体 G タンパク質の α サブユニット遺伝子に関する変異体 *d1* は, 原品種より病害抵抗性が弱まっているが, OsRac1 を導入して恒常的に活性型にした形質転換体は病害抵抗性が回復したことから, 三量体 G タンパク質は OsRac1 の上流で働いていると考えられた(Shimamoto and Kyojuka 2002, Suharsono *et al.* 2002). 従って, 本研究において病害抵抗性を示した *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* も, Osrac1 の作用するシグナル伝達経路の遺伝子に変異が生じている可能性が考えられる.

本研究で新たに同定した擬似病斑葉変異体 *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* の病害抵抗性程度について比較したところ, 優性の変異体と劣性の変異体にグループ分けされた. 優性の変異体である *Spl12* および *Spl15* は劣性の変異体である

spl5-2, *spl13* および *spl14* より, 生育初期から擬似病斑が現れ, 擬似病斑面積比率も高く, 病害抵抗性の程度も強かった. 従って, *Spl12* および *Spl15* は *Spl* 遺伝子の過剰発現により病害抵抗性に関して正の制御をしていると考えられる. 最近, カラシナ由来の抗菌タンパク質のディフェンシン遺伝子の組換えイネがいもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示すことが明らかになった(川田ら 2003). また, ストレスにより誘導されるイネの 1,3;1,4- β グルカナーゼ遺伝子である *Gns1* をイネで過剰発現させる組換え体ではいもち病に対して抵抗性が誘導されるとともに病原菌の感染なく擬似病斑葉が生じ, その際には *PRI* および *PBZI* 遺伝子の発現が誘導されていることがわかった (Nishizawa *et al.* 2003). 従って, *Spl12* および *Spl15* においてもディフェンシン遺伝子や 1,3;1,4- β グルカナーゼ遺伝子のような病害抵抗性関連遺伝子の過剰発現により病害抵抗性が誘導されている可能性も考えられる.

一方, 劣性の変異体である *spl5-2*, *spl13* および *spl14* の原因遺伝子は病害抵抗性に関する負の制御因子であり, *Spl12* および *Spl15* より作用力が小さいと考えられる. *spl5-2*, *spl13* および *spl14* のうち, *spl13* および *spl14* は擬似病斑が現れる前の若い植物体においても抵抗性が誘導されていた. 従って, 擬似病斑が病害抵抗性に必要条件ではない可能性も考えられる.

2 イネの病害抵抗性育種の展望

日本における水稻の作付面積の合計は約 150 万ヘクタールであるが(2001 年度), 作付面積第 1 位の良食味品種「コシヒカリ」の作付は 36.4%におよび, 第 2 位の「ひとめぼれ」と第 3 位の「ヒノヒカリ」を合わせると, 50%を超える(水陸稲・麦類・大豆奨励品種特性表 2002). 「ひとめぼれ」も「ヒノヒカリ」も「コシヒカリ」を片親にして育成された良食味品種であり, 現在作付されている主要な品種は, 「コシヒカリ」とその系譜につながる品種である. 現在と 1970 年頃とを比較すると, 少数品種への作付集中が進んでおり, 全体的に食味は向上している一方, 「コシヒカリ」は耐倒伏性やいもち病抵抗性が弱いという欠点があるため, 収量性やいもち病抵抗性の改良は不十分である (井辺 2002). また, 最近では, 野菜の残留農薬の問題が新聞やテレビでも大きく取り上げられ, 消費者の食品に対する安全指向が一段と強まっている.

こうした背景の中で, 無農薬または減農薬を可能とする, 複合的に病害抵抗性をもつ良食味品種の育成が重要な育種目標となっている. 各育成地では, 既存の品種の中で病害抵抗性に優れた品種と良食味品種の交配を数多く行うとともに, 病害抵抗性検定の精度を上げるなどの工夫を行っている. また, 病害抵抗性の遺伝資源として,

外国稲や陸稲なども利用されている。しかしながら、良食味を維持し病害抵抗性を有する品種を育成することは難しい。

いもち病については陸稲の高度な圃場抵抗性が注目されており、DNA マーカーによる選抜が試みられているが、菌のレースに対して非特異的に安定した抵抗性を示すのかどうかはまだ明らかではない(井辺 2002)。

オオムギの擬似病斑葉変異体 *mlo* では、うどんこ病に対してレース非特異的に抵抗性を示し、表皮細胞の細胞壁に非親和性のうどんこ病に対する抵抗性反応として見られるような変化が自発的に生じることにより抵抗性を獲得したと考えられた(Wolter *et al.* 1993)。しかしながら、*mlo* はイネのいもち病菌を強制的に感染させると原品種より罹病性を示し、全身獲得抵抗性(SAR)には Mlo タンパク質は関与していない可能性が示唆された(Jarosch *et al.* 1999, 2003)。本実験において、*spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* はいもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示したことから、*mlo* とは異なる抵抗性の作用機作が働いていると考えられる。しかし、農業上の利用を考えた場合、今後いもち病および白葉枯病以外の病害抵抗性が罹病性に変化していないか明らかにする必要がある。

いもち病と白葉枯病はイネの重要病害である。*spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* はいもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示し、これらは抵抗性育種素材として有用であると思われる。本実験では、白葉枯病菌を様々な生育ステージの植物体に接種することによって、優性の変異体である *Spl12* および *Spl15* は劣性の変異体である *spl5-2*, *spl13* および *spl14* より、生育初期から擬似病斑が現れ、擬似病斑面積比率も高く、病害抵抗性の程度も強いことが明らかになった。また、比較品種と擬似病斑葉変異体の白葉枯病抵抗性を比較した場合、*Spl12* および *Spl15* はあそみのりと同程度かやや強い抵抗性を示し、*spl5-2*, *spl13* および *spl14* は、日本晴とほぼ同程度の抵抗性を示したと推定できる。

コムギの劣性の擬似病斑葉変異体 C591 は *puccinia reconditea* f. sp. *tritici* に中程度の抵抗性を示すが、一穂あたりの粒数はほぼ野生型と同程度である (Nair and Tomar 2001)。これは、C591 の擬似病斑の発現時期が遅く、穂ばらみ期からであることにより擬似病斑による収量の減少を抑えていることによると考えられる。いもち病および白葉枯病に抵抗性を示した変異体のうち、*spl5-2*, *spl13* および *spl14* は擬似病斑の発現時期が遅く、*spl13* および *spl14* は擬似病斑の表れる前から抵抗性を示す。しかしながら、これらは野生型に比べて収量が低い。これらの変異体を利用していくには、農業上の劣悪形質を取り除かないといけない。本実験において *spl13*, *spl14*, *Spl15* お

よび *sp15-2* について戻し交配を行ったが、いずれの戻し交配集団 (BC_1F_3) においても、一株籾重がヒノヒカリ又はコシヒカリより軽く、さらに戻し交配を進めて改良を進める必要があると考えられる。

オオムギの病斑葉突然変異遺伝子である *mlo* では、いくつかの複対立遺伝子がうどんこ病抵抗性を保持したまま、擬似病斑の発現程度を低くすることができることがわかり、農業上の利用がヨーロッパを中心に進んだ(Jørgensen 1992)。同じように、シロイヌナズナでは、*acd1-12* と *acd1-20* という複対立遺伝子の組み合わせでは、病害抵抗性は保持しながら、ある程度正常な生育を示した (Yin *et al.* 2000)。本実験において病害抵抗性を示した *sp15-1* と *sp15-2* の抵抗性程度については比較できなかったが、今後 *sp15* 遺伝子のクローニングを行うとともに抵抗性程度の比較を行うことによって、*sp15-1* と *sp15-2* の塩基配列の違いと病害抵抗性程度の関連について解析することが可能である。

擬似病斑葉突然変異遺伝子の農業上の利用のやり方として、戻し交配ではなく、病害により発現が誘導されるようなプロモーターで擬似病斑葉突然変異遺伝子の発現をコントロールする方法がある。タバコとトマトにおいては、擬似病斑葉を示す *bacterio-opsin* 遺伝子を病害により発現が誘導されるようなプロモーターにつなげた組換え体は、自発的な擬似病斑は表れないが、病原菌に対して抵抗性を示した (Rizhsky and mittler 2001)。

本研究において、一部の擬似病斑葉変異体でいもち病および白葉枯病に対して抵抗性が誘導されていることが明らかになり、これらはいずれの病害に対してもレース非特異的な抵抗性を示し、複合的に病害抵抗性をもつ品種育成の遺伝資源としての可能性が示唆された。擬似病斑葉変異体を分子レベルで解析することは収量などの農業形質を損ねることなく複数の病害に対する安定的な抵抗性を持つ植物を作る上で、極めて重要であると考えられる。

VII 摘要

植物体内への病原菌の侵入に対する抵抗性反応の一つに過敏感反応と言われる現象がある。これは、病原菌の侵入を受けた細胞およびその周辺の細胞が死ぬことにより、それ以上病原菌が広がるのを防ぐ現象である。擬似病斑葉変異体は、病原菌の存在の有無に関わらず過敏感反応に似た褐点を葉身などに形成するもので、今までにシロイヌナズナやオオムギなどの多くの植物において同定されてきた。さらに、いくつかの擬似病斑葉変異体は病原菌に対して抵抗性を示すことが明らかになり、それらは植物の過敏感反応を解析するための有用な材料であると考えられている。イネにおいても、1965 年に関口病斑という病斑状の褐点が葉身に現れる擬似病斑葉変異体が同定されて以来、複数の擬似病斑葉変異体(*spotted leaf 1 (spl1)* ~ *spl11*)が見つけられている。しかしながら、それらの変異体間での擬似病斑の程度の比較や農業形質との関連についてはあまり明らかにされていない。

本研究では、イネにおける病害抵抗性がどのように制御されているかを明らかにする目的で、擬似病斑葉変異体を詳細に解析するとともに、それらの病害抵抗性および PR タンパク質などの病害抵抗性関連の遺伝子の発現について解析した。さらに、有望と思われる擬似病斑葉変異体について実用品種への戻し交配系統を作出して、それらの農業形質の評価を試みた。

1. 擬似病斑葉突然変異体の表現型の解析

メチルニトロソウレアによる変異原処理を行った M_2 又は M_3 世代の合計 13000 系統の中から、病原菌の接種なしで自発的に葉身に褐点が現れ、しかもイネいもち病菌を接種した時、原品種より病斑の伸展程度の低い 5 系統を同定した。遺伝分析の結果、2 系統が単因子優性の突然変異であり、3 系統が単因子劣性の突然変異であった。また、これらの変異体および既知の擬似病斑葉変異体を用いた対立性検定の結果、これらの 5 つの擬似病斑葉変異体のうち、1 つが *sp15-1* と対立関係にあることがわかり *sp15-2* とした。残りの 4 つの突然変異は新しい遺伝子座に由来することが明らかとなり、*Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* と名付けた。

新しく見いだされた擬似病斑葉変異体と既知の擬似病斑葉変異体を用いて、擬似病斑の色、大きさ、発生する時期、発生する器官について調査した。

生育初期から擬似病斑が現れるのは *spl1*, *spl2*, *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *Spl7*, *Spl12* および *Spl15* であり、*spl2* および *Spl12* では第 2 葉、*spl1* では第 3 葉、*spl3*, *spl4*, *spl5-1*,

spl7 および *Spl15* では第 4 葉から擬似病斑が現れた。*spl5-2* および *spl6* では第 6 葉から擬似病斑が現れ、*spl8*, *spl9*, *spl10* および *spl13* では第 9 葉または第 10 葉から擬似病斑が初めて見られた。*spl14* は特異的な発現パターンを示し、第 2 葉、第 3 葉および第 4 葉で擬似病斑が出現したが、第 5 葉および第 6 葉では擬似病斑が見られず、第 7 葉から再び擬似病斑が現れた。擬似病斑の大きさは直径が 3mm 以下の系統が多かったが、*spl1* および *spl2* では擬似病斑同士がつながり広がった。擬似病斑の色は赤茶色の系統が多かったが、灰色、黄色なども存在した。

spl3, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl9*, *Spl12* (ホモ), *spl14* および *Spl15* においては、葉身以外に、止葉の葉鞘、外穎、内穎、枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られた。*spl1*, *spl2*, *spl4*, *Spl12* (ヘテロ) および *spl13* においては止葉の葉鞘、外穎、内穎、枝梗のいずれかで擬似病斑が見られた。*spl6*, *spl8* および *spl10* においては、葉身以外では擬似病斑が見られなかった。

次に農業形質を調査した。優性の変異体である *Spl12* および *Spl15* は、稈長、穂長、一株穂数および一株籾重のいずれも極めて小さかった。劣性の変異体の多くは、稈長、穂数、および一株籾重が原品種より小さかったが、*spl6*, *spl8* および *spl10* のように一株籾重が原品種と同程度またはやや大きい系統も存在した。

2. 擬似病斑葉突然変異体の病害抵抗性

新しく見いだされた擬似病斑葉変異体と既知の擬似病斑葉変異体に関して病害抵抗性を調査した結果、*spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* において、いもち病および白葉枯病に対して抵抗性が誘導されていることが明らかになり、いずれもレース特異性はないと考えられた。

次に、優性の変異体である *Spl12* のホモ個体とヘテロ個体の擬似病斑の発現程度と病害抵抗性を比較した。*Spl12* のヘテロ個体は稈長、穂長および一株籾重について、*Spl12* のホモ個体と原品種の中間的な値を示し、擬似病斑の発現程度もホモ個体より少なかったが、いもち病および白葉枯病に対する抵抗性はホモ個体と同程度誘導されていた。

次に、病害抵抗性を示した擬似病斑葉変異体のうち *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* について、いもち病および白葉枯病抵抗性が植物体のどの生育ステージから誘導されているか調査した。播種後 8 週目の植物体の葉鞘向軸面にいもち病菌を接種したところ、葉身に擬似病斑が見られた *Spl12*, *spl5-2* および *Spl15* のうち、*Spl12* ではいもち病菌の付着器からの菌糸の伸びは原品種より抑制されていたが、*spl5-2* およ

び *Spl15* の付着器からの菌糸の伸展程度はほぼ原品種と同程度であり、まだ抵抗性は誘導されていなかった。播種後 8 週目の *spl13* と *spl14* の葉身には擬似病斑がまだ見られなかったが、付着器は形成されるものの菌糸の伸展は極めて抑制されており抵抗性が誘導されていた。播種後 12 週目では、*spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* のいずれも葉身に擬似病斑が現れ、付着器からの菌糸の伸展が原品種より抑制されていた。*spl13* は播種後 8 週目および 12 週目のいずれにおいても、いもち病菌の付着器の付いた細胞の細胞質が褐色に変化していた。

spl5-2, *Spl12* の止葉および止葉から数えて連続する 3 枚の葉について、出穂期に白葉枯病菌を接種したところ、全ての葉が抵抗性を示した。また、抵抗性の程度は *spl5-2*, *Spl12* および各々の原品種のいずれも、下位葉より上位葉で大きかった。*spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* について、播種後 2, 4, 6, 8, および 10 週の最上位展開葉に、白葉枯病菌を接種するとともに、各生育ステージにおける擬似病斑面積比率を調査したところ、優性の変異体である *Spl12* および *Spl15* は、劣性の変異体である *spl5-2*, *spl13* および *spl14* と比較し、生育初期から擬似病斑が現れ、擬似病斑面積比率も高く、病害抵抗性の程度も強かった。

二重変異体 *Spl12 spl14* では、擬似病斑の発現程度は *Spl12*, *spl14* より激しく、相加的であったが、白葉枯病菌に対する抵抗性は *spl14* とほぼ同程度であり、相加的ではなかった。

3. 擬似病斑葉突然変異体における病害抵抗性関連遺伝子の発現

病害抵抗性を示した *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* を用いて、植物体内での病害抵抗性関連の遺伝子の発現について調査した。

病害抵抗性関連遺伝子の *PR1*, *PBZ1* およびキチナーゼ (*Chi3*) は、擬似病斑の出現後抵抗性を示した *spl5-2*, *Spl12* および *Spl15* では、擬似病斑の現れた後で発現が誘導された。擬似病斑出現前に抵抗性を示した *spl13* および *spl14* では、擬似病斑の現れる前から発現が見られた。従って、これらの変異体の病害抵抗性は病害抵抗性関連遺伝子の発現と強く相関していた。

4. 擬似病斑葉突然変異体の実用品種への戻し交配系統の農業形質の評価

spl13, *spl14*, *Spl15* および *spl5-2* の農業形質を改良する目的で、ヒノヒカリあるいはコシヒカリとの F₂ に対し戻し交配を行ったところ、いずれの戻し交配系統 (BC₁F₂) においても、一株籾重の標準偏差が大きく、系統内での個体間のばらつきが大きいこと

が示唆された。 *spl13* および *spl14* の戻し交配系統では、一株籾重がヒノヒカリと同程度又はやや小さい程度まで改良されていたが、 *spl5-2* の戻し交配系統では、一株籾重があまり増えていなかった。 *Spl15* の戻し交配系統ではコシヒカリより小さいが、 *Spl15* より極めて大きくなっていた。

BC_1F_3 でもほとんどの系統において、依然として一株籾重がヒノヒカリ又はコシヒカリより小さかった。 一株籾重が小さくなる原因として、 *spl13* では穂長および籾百粒重、 *spl5-2* では稈長、穂長、および籾百粒重、 *spl14* では籾百粒重、 *Spl15* では稈長、一株穂数、および籾百粒重が少ないことによると考えられた。 しかし、 BC_1F_2 系統よりも農業形質は全体的に改良されており、さらに戻し交配と選抜を進めることにより、実用化の可能性があると考えられた。

以上、本研究では、イネの擬似病斑葉変異体を用いて、イネの発育と擬似病斑の発現との関係を詳細に明らかにするとともに、多くの変異体は、いもち病、白葉枯病に対する抵抗性を示すことを明らかにした。 さらに戻し交配を行い、農業形質改善の可能性について検討した。

VIII 謝辞

本研究の実施においては九州大学大学院生物資源環境科学府佐藤光教授には既知の擬似病斑葉変異体の種子および MNU 処理 M_2 種子を分譲していただいた。九州大学大学院農学研究院吉村淳教授，北海道大学大学院農学研究科高牟禮逸郎助手には既知の擬似病斑葉変異体の種子を分譲していただいた。九州沖縄農業研究センター(旧九州農業試験場)の小川紹文博士(現宮崎大学農学部)，平林秀介博士(現作物研究所)には，MNU 処理 M_2 種子を分譲していただいた。九州沖縄農業研究センター(旧九州農業試験場)の岩野正敬博士(元中央農業総合研究センター)にはいもち病菌を分譲していただくとともに，接種にあたって多くのご指導をいただいた。農業生物資源研究所の西澤洋子博士には，キチナーゼ遺伝子のクローンを分譲していただくとともに，実験にあたって多くのご指導をいただいた。

さらに本研究の遂行にあたって，励ましと助言を惜しまれなかった九州沖縄農業研究センター(旧九州農業試験場)の下坪訓次元水田利用部長，脇本賢三前水田作研究部長をはじめ，水田作研究部の先輩，同僚諸氏，終始研究を支援してくださった稲育種研究室の八木忠之元室長(現中央農業総合研究センター)，西村実元室長(現農業生物資源研究所)，岡本正弘前室長(現九州沖縄農業研究センター企画調整部)，深浦壮一元技官(現熊本県農業研究センター)，田村克徳技官，梶亮太技官，富松高治元研究員(現八洲化学工業株式会社)の惜しみないご協力に対して深く感謝をささげる。

本稿を草するにあたり，東京大学大学院農学生命科学研究科長戸康郎教授から終始懇篤なるご指導とご校閲をいただいた。厚く御礼を申し上げます。

引用文献

Agrawal, G. K., Jwa, N.-S., and Rakwal R. (2000). A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 157-165.

芦澤武人, 善林薫, 園田亮一 (1997). ササニシキ同質遺伝子系統の葉身細胞でのいもち病菌に対する真性抵抗性発現について. 日本植物病理学会報 **63**, 226-227.

芦澤武人, 善林薫, 小泉信三 (1998). ササニシキ同質遺伝子系統の葉身における非親和性いもち病菌による誘導抵抗性発現の系統間差. 日本植物病理学会報 **64**, 364.

Arase, S., Zhao C.-M., Akimitsu K., Yamamoto M., and Ichii M. (2000). A recessive lesion mimic mutant of rice with elevated resistance to fungal pathogens. *J. Gen. Plant Pathol.* **66**, 109-116.

Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F., and Dong, X. (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1845-1857.

Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X. (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* **9**, 1573-1584.

Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., and Schulze-Lefert, P. (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**, 695-705.

Bryan, G.T., Wu, K.-S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P., McAdams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R., and Valent, B. (2000). A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* **12**, 2033-2045.

Cooper, B., Clarke, J.D., Budworth, P., Kreps, J., Hutchison, D., Park, S., Guimil, S., Dunn, M., Luginbühl, P., Ellero, C., Goff, S.A., and Glazebrook, J. (2003). A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4945-4950.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A., and Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793-1807.

Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., and Dangl, J.L. (1994). Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**, 565-577.

Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., and Dangl, J.L. (1997). A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**, 685-694.

Flor, H.H. (1956). The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* **8**, 29-54.

Gray, J., Close, P.S., Briggs, S.P., and Johal, G.S. (1997). A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Lls1* gene in maize. *Cell* **89**, 25-31.

Greenberg, J.T. (2000). Positive and negative regulation of salicylic acid-dependent cell death and pathogen resistance in Arabidopsis *Isd6* and *ssi1* mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 877-881.

Greenberg, J.T., and Ausubel, F.M. (1993). *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J.* **4**, 327-341.

Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., and Ausubel, F.M. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**, 551-563.

Greenberg, J.T., Silverman, F.P., and Liang H. (2000). Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics* **156**, 341-350.

Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.

Hu, G., Richter, T.E., Hulbert, S.H., and Pryor, T. (1996). Disease lesion mimicry caused by mutations in the rust resistance gene *rp1*. *Plant Cell* **8**, 1367-1376.

Hu, G., Yalpani, N., Briggs, S.P., and Johal, G.S. (1998). A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *Plant Cell* **10**, 1095-1105.

井辺時雄 (2002). わが国のイネ品種開発の現状. *農林水産技術 研究ジャーナル* **25**, 35-41.

Iwata, M., Suzuki, Y., Watanabe, T., Mase, S., and Sekizawa, Y. (1980). Effect of probenazole on the activities of enzymes related to the resistant reaction in rice plant. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **46**, 297-306.

Iwata, N. (1996). Report of committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genet. Newsl.* **13**, 12-18.

Jabs, T., Dietrich, R.A., and Dangl, J.L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**, 1853-1856.

Jarosch, B., Kogel, K.-H., and Schaffrath, U. (1999). The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 508-514.

Jarosch, B., Jansen, M., and Schaffrath, U. (2003). Acquired resistance functions in *mlo* barley, which is hypersusceptible to *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**, 107-114.

Jirage, D., Zhou, N., Cooper, B., Clarke, J.D., Dong, X.N., and Glaxebrook, J. (2001). Constitutive salicylic acid-dependent signaling in *cpr1* and *cpr6* mutants requires PAD4. *Plant J.* **26**, 395-407.

Johal, G.S., Hulbert, S.H., and Briggs S.P. (1995). Disease lesion mimics of maize: a model for cell death in plants. *Bioessays* **17**, 685-692.

Jørgensen, J.H. (1992). Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* **63**, 141-152.

川田元滋, 大島正弘, 田中喜之, 井沢典彦 (2003). 我が国独自の技術で安心な組換えイネを開発—大規模な減農薬栽培を実現する成果—. 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 プレスリリース(平成15年12月22日).
<http://www.affrc.go.jp/ja/press/2003/031222/031222/html>

Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A., and Uchimiya, H. (2001). Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis Bax Inhibitor-1 (Atbi-1)*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12295-12300.

川崎努, 島本功 (1997). 細胞死と病害抵抗性. 「分子レベルからみた植物の病害抵抗性」 山田哲治, 島本功, 渡辺雄一郎(編) 秀潤社 124-130.

Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., and Shimamoto, K. (1999). The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10922-10926.

Kinoshita, T. (1995). Report of committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genet. Newsl.* **12**, 9-153.

Kiyosawa, S. (1970). Inheritance of a particular sensitivity of the rice variety, Sekiguchi Asahi, to pathogens and chemicals, and linkage relationship with blast resistance genes. *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. Ser. D.* **21**, 61-71.

Koga, H. (1994). Hypersensitive death, autofluorescence, and ultrastructural changes in cells of leaf sheaths of susceptible and resistant near-isogenic lines of rice (*Pi-z¹*) in relation to penetration and growth of *Pyricularia oryzae*. *Can. J. Bot.* **72**, 1463-1477.

櫛渕欽也 (1992). 白葉枯病. 「日本の稲育種」 農業技術協会 279-289.

Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.

Lin, W., Anuratha, C.S., Datta, K., Potrykus, I., Muthukrishnan, S., and Datta, S.K. (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biotechnology* **13**, 686-691.

Mach, J.M., Castillo, A.R., Hoogstraten, R., and Greenberg, J.T. (2001). The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 771-776.

Marchetti, M.A., Bollich, C.N., and Uecker, F.A. (1983). Spontaneous Occurrence of the Sekiguchi lesion in two American rice lines: its induction, inheritance, and utilization. *Phytopathology* **73**, 603-606.

松尾孝嶺 (1990). 第2章 形態的形質の遺伝. 「稲学大成 第三卷 遺伝編」農文協 169-248.

McElroy, D., Blowers, A.D., Jeness, B., and Wu, R. (1991). Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 150-160.

Midoh, N., and Iwata, M. (1996). Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol.* **37**, 9-18.

Midoh, N., and Iwata, M. (1997). Expression of defense-related genes by probenazole or 1, 2-benzisothiazole-3(2H)-one 1, 1-dioxide. *J. Pesticide Sci.* **22**, 45-47.

Mittler R., and Lam, E. (1996). Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends Microbiol.* **4**, 10-15.

森昌樹, 富田千賀子, 杉本和彦, 大岡久子, 小野寺治子, 梶原英之, 田中宥司, 関本均, 廣近洋彦, 菊池尚志 (2003). イネのアクチベーションタギングラインの作製及び lesion-mimic 変異体の解析. 第 43 回日本植物生理学会講演要旨集 p199.

長田敏行, 内宮博文(1995). 生体防御の分子機構. 「植物の遺伝子発現」 講談社 137-179.

Nair, S.K., and Tomar, S.M.S. (2001). Genetical and anatomical analyses of a leaf flecking mutant in *Triticum aestivum* L. *Euphytica* **121**, 53-58

西澤洋子, 阿久津克己, 日比忠明 (1992). 植物溶菌酵素遺伝子導入による菌類病抵抗性植物の作出. 植物防疫 **46**, 22-28.

Nishizawa, Y., Kishimoto, N., Saito, A., and Hibi, T. (1993). Sequence variation, differential expression and chromosomal location of rice chitinase genes. *Mol. Gen. Genet.* **241**, 1-10.

Nishizawa, Y., Nishio, Z., Nakazono, K., Soma, M., Nakajima, E., Ugaki, M., and Hibi, T. (1999a). Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor. Appl. Genet.* **99**, 383-390.

Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.-Y., Shibuya, N., and Minami, E. (1999b). Regulation of the chitinase expression in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Mol. Biol.* **39**, 907-914.

Nishizawa, Y., Saruta, M., Nakazono, K., Nishio, Z., Soma, M., Yoshida, T., Nakajima, E., and Hibi, T. (2003). Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *Gns1*. *Plant Mol. Biol.* **51**, 143-152.

Ogawa, T., and Sekizawa, K. (1980). Studies on the breeding of rice varieties resistant to bacterial leaf blight. 2. Test of the quantitative resistance of rice native varieties in Japan by clipping inoculation method. Bull. Chugoku. Natl. Agric. Exp. Stn. Ser. A **27**, 19-36.

Ono, E., Wong, H.L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O., and Shimamoto, K. (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 759-764.

Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., and Greenberg, J.T. (1999). The gain-of-function Arabidopsis *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. Plant Cell **11**, 1695-1708.

Rizhsky, L., and Mittler, R. (2001). Inducible expression of bacterio-opsin in transgenic tobacco and tomato plants. Plant Mol Biol **46**, 313-323.

佐々木卓治 (2004). イネ研究の現状と将来の方向性について—イネ全ゲノム配列決定をうけての研究者からの提案—. 3-1-1 病害抵抗性研究 p23-29.

佐藤宏之, 出田収, 安東郁男, 國廣泰史, 平林秀介, 岩野正敬, 宮坂篤, 太田久稔, 根本博, 井辺時雄 (2003). イネ系統「WSS2」が保有する紋枯病抵抗性に関するQTL解析. 育種学研究 5(別2), 335.

Schroder, M., Hahlbrock, K., and Kombrink, E. (1992). Temporal and spatial patterns of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. Plant J. **2**, 161-172.

Schweizer, P., Buchala, A., Dudler, R., and Métraux, J.P. (1998). Induced systemic resistance in wounded rice plants. Plant J. **14**, 475-481.

Sekiguchi, Y., and Furuta, T. (1965). On a rice mutant showing particular reaction to some spotting diseases. Preliminary report. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **30**, 71-72 (Abstr. in Japanese).

Shimamoto, K., and Kyojuka, J. (2002). Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 399-419.

Song, F.M., and Goodman, R.M. (2001). Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**, 1-11.

Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.S., Pi, L.-Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C., and Ronald, P. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**, 1804-1806.

Suharsono, U., Fujisawa, Y., Kawasaki, T., Iwasaki, Y., Satoh, H., and Shimamoto, K. (2002). The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13307-13312.

Takahashi, A., Kawasaki, T., Henmi, K., Shii, K., Kodama, O., Satoh, H., and Shimamoto, K. (1999). Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant J.* **17**, 535-545.

Takahashi, H., Chen, Z., Du, H., Liu, Y., and Klessig, D.F. (1997). Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J.* **11**, 993-1005.

鵜飼保雄 (2002). 5.7 戻し交雑育種法 「植物育種学 交雑から遺伝子組換えまで」 東京大学出版会 131-137.

八重樫博志, 鳥山重光 (1997). 6 病気に対する作物の抵抗性. 植物防疫講座 第3版 病害編 84-95.

Wang, Z.X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H., Katayose, Y., and Sasaki, T. (1999). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine -rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.* **19**, 55-64.

Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H.-Y., and Ryals, J. (1995). Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis* *Isd* mutants. *Plant Cell* **7**, 2013-2022.

Wolter, M., Hollricher K., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1993). The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 122-128.

Yamanouchi, U., Yano, M., Lin, H., Ashikari, M., and Yamada, K. (2002). A rice spotted leaf gene, *Sp17*, encodes a heat stress transcription factor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7530-7535.

Yin, Z., Chen, J., Zeng, L., Goh, M., Leung, H., Khush, G.S., and Wang, G.-L. (2000). Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 869-876.

Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z.-X., Kono, I., Kurata, N., Yano, M., Iwata, N., and Sasaki, T. (1998). Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1663-1668.

山崎義人, 高坂 卓爾 (1980). いもち病菌の一般的試験法(5. 接種法). 「イネのいもち病と抵抗性育種」 博友社 150-158.

Yu, G-L., Katagiri, F., and Ausubel, F.M. (1993). Arabidopsis mutations at the *RPS2* locus result in loss of resistance to *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 434-443.

水陸稻・麦類・大豆奨励品種特性表 (2002). 農林水産省生産局編 農業技術協会刊 16-18.